

**Kleine Enzyme mit großer Perspektive:
Funktionelle Beschreibung und optogenetische
Anwendung von photoaktivierbaren Adenylatzykласen**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat.
im Fach Biophysik

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Humboldt-Universität zu Berlin

von
Diplom-Biophysikerin Manuela Stierl

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:
Prof. Dr. Stefan Hecht

Gutachter:

1. Prof. Dr. P. Hegemann
2. Prof. Dr. W. Gärtner
3. Prof. Dr. F. Bartl

eingereicht am: 28.02.2013

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.2013

Für Isabel und Jakob

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Penzkofer A., Tanwar M., Veetil S., Kateriya S., **Stierl M.** und Hegemann P. (2013): Photo-Dynamics and Thermal Behavior of the BLUF Domain Containing Adenylate Cyclase NgPAC2 from the Amoeboflagellate *Naegleria gruberi* NEG-M Strain. *Chem. Phys.* 412, 96-108.

Penzkofer A., **Stierl M.**, Hegemann P. und Kateriya S. (2012): Absorption and Fluorescence Characteristics of Photo-Activated Adenylate Cyclase Nano-Clusters from the Amoeboflagellate *Naegleria gruberi* NEG-M Strain. *Chem. Phys.* 292, 46-54.

Penzkofer A., **Stierl M.**, Hegemann P. und Kateriya S. (2011): Thermal Protein Unfolding in Photo-Activated Adenylate Cyclase Nano-Clusters from the Amoeboflagellate *Naegleria gruberi* NEG-M Strain. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 225, 42-51.

Penzkofer A., **Stierl M.**, Hegemann P. und Kateriya S. (2011): Photo-Dynamics of the BLUF Domain Containing Soluble Adenylate Cyclase (nPAC) from the Amoeboflagellate *Naegleria gruberi* NEG-M Strain. *Chem. Phys.* 387(1-3), 25-38.

Stierl M., Stumpf P., Udvari D., Gueta R., Hagedorn R., Losi A., Gärtner W., Peterreit L., Efetova M., Schwärzel M., Oertner T., Nagel G. und Hegemann P. (2011): Light Modulation of Cellular cAMP by a Small Bacterial Photoactivated Adenylyl Cyclase, bPAC, of the Soil Bacterium *Beggiatoa*. *J. Biol. Chem.* 286 (2), 1181-1188.

In Vorbereitung:

Stierl M., Mathes T., Penzkofer A., Kennis JT., Schlichting I. und Hegemann P. : Inversion of the Light-Dependence of a Photoregulated Cyclase bPAC.

Vorträge und Posterpräsentationen auf DFG-Veranstaltungen und Konferenzen:

Vortrag und Poster

„Inversion of the Light-dependence of a Photoregulated Cyclase bPAC“, Gordon Research Seminar, Galveston, Texas, USA (2012)

Vortrag

„Photoactivated Adenylyl Cyclases for Optogenetic Application“, 14th Congress of the European Society for Photobiology, Genf, Schweiz (2011)

Vortrag

„Small PACs for Optogenetic Application“, Jahrestagung der DFG-Forschergruppe FOR1279 „Protein-based photoswitches as optogenetic tools“, München, Deutschland (2011)

Poster

„A Bacterial Photo-Activated Cyclase (PAC) as an Improved Tool for Controlling cAMP in Neuronal Tissues“, Jahrestagung der DFG-Forschergruppe FOR526 „Blue light photoreceptors“, Frauenchiemsee, Deutschland (2010)

Poster

„A Bacterial Photo-Activated Cyclase (PAC) as an Improved Tool for Controlling cAMP in Neuronal Tissues“, Scientific Advisory Board Treffen des Exzellenzclusters „UniCat“, TU Berlin, Deutschland (2010)

Poster

„Expression and Preliminary Analysis of Enzyme Photoreceptors“, Jahrestagung der DFG-Forschergruppe FOR526 „Blue light photoreceptors“, Staufen/ Breisgau, Deutschland (2009)

Poster

„Functional Investigation of the BLUF Signal Transduction in Photo-Activated Adenylyl-Cyclase PAC from *E. gracilis*“, Jahrestagung der DFG-Forschergruppe FOR526 „Blue light photoreceptors“, Strahlfeld/ Regensburg, Deutschland (2008)

Abstract

Optogenetics represent the use of genetically encoded photoreceptor proteins to control specific parameters of cells by light. To particularly access optic control of the second messenger cyclic adenosine monophosphate (cAMP) we tested the suitability of four newly identified photoactivated adenylyl cyclases (PAC). Their genes originate from a soil bacterium *Beggiatoa* sp. and from an amoeboid flagellate *Naegleria gruberi*. They code for 350 to 489 aa small proteins consisting of one blue light sensing BLUF (blue light sensors using FAD) and of an adenylyl cyclase domain.

Cell based functional assays in *E. coli*, *Xenopus* oocytes and CHO cells as well as in vitro analysis of recombinant protein reveal that all four PACs are light activated adenylyl cyclases. Moreover the bacterial PAC (bPAC) has the highest potential for an optogenetic application because it shows a high light activity and a large light to dark activation. To demonstrate the advantage of bPAC over the established *Euglena* PAC α we compared both proteins in *Xenopus* oocytes, rat neurons and *Drosophila* fruit flies. It appears that bPAC features a lower activity in the dark, a higher light sensitivity and a broader dynamic range. Therefore bPAC is the superior optogenetic tool in many applications.

In an analytical approach we investigated the impact of the BLUF domains on regulation of the cyclase. Removal of the BLUF domains left the bPAC cyclase in an inactive state. Mutating BLUF residues, which are involved either in photochemistry or signal transduction, resulted in a partially active dark state and reduced light activation of bPAC. Thus the integrity of the BLUF domain hydrogen bond network is essential for functional regulation of bPAC. As a result from application oriented optimization a bPAC variant with reduced dark activity as well as a variant that forms a stable neutral flavin radical was obtained.

Zusammenfassung

Optogenetik ist eine neue biotechnologische Methode, die durch Einbringen lichtregulierbarer Proteine die präzise Kontrolle spezifischer Zellparameter durch Licht ermöglicht. Mit dem Ziel, die Verfügbarkeit an zellmanipulierenden Werkzeugen für die Aufklärung biochemischer Signaltransduktionswege zu verbessern, wurden vier neu identifizierte, photoaktivierbare Adenylatzyklasten (PACs) auf ihre Eignung getestet. Die vier PACs sind BLUF-Photorezeptoren mit bislang unbekannter Funktion und kommen in dem Amoeboflagellaten *Naegleria gruberi* und dem Schwefelbakterium *Beggiatoa* vor.

In einem bakteriellen Reportergen-, einem elektrophysiologischen Oozyten- und einem Lumineszenz-basierten Säugerzelltest wurde die Funktionalität der vier Kandidaten nachgewiesen. Durch Verwendung eines Fusionsmarkers gelang es, rekombinantes Protein von allen PACs zu erhalten. Die *in vitro* bestimmten photochemischen und enzymatischen Eigenschaften korrelieren mit dem Aktivitätsverhalten in den Funktionstests und demonstrieren das Anwendungspotenzial der bakteriellen Zyklaste bPAC.

Die Charakterisierung ergibt, dass bPAC bei vergleichsweise geringer Basalaktivität über eine hohe Lichtaktivität verfügt und somit einen breiten dynamischen cAMP-Bereich abdeckt. Weiter verfügt bPAC über eine hohe Lichtsensitivität; die Dauer der Enzym-inaktivierung liegt im Sekundenbereich. Zusammen mit ihrer geringen Größe (40 kDa) machen diese Merkmale bPAC zu einem nützlichen optogenetischen Werkzeug.

Um dies zu bestätigen, wurde in Kooperation mit verschiedenen Nutzern ein detaillierter Vergleich zwischen bPAC und dem bereits etablierten euPAC α aus *Euglena gracilis* durchgeführt. Die Anwendungen in Frosch-Oozyten, in Ratten-Neuronen und in *Drosophila*-Fliegen zeigen auf, dass sich bPAC gegenüber euPAC α insbesondere durch eine geringere Dunkelaktivität und eine wirkungsvolle lichtinduzierte cAMP-Produktion auszeichnet. bPAC vermittelt bei gleicher Lichtintensität länger anhaltende Effekte; dies ist speziell in Anwendungen vorteilhaft, in denen Licht nur begrenzt appliziert werden kann. Die besonders im neuronalen Kontext zu Tage tretenden, verbesserten Eigenschaften bPACs machen es zu einem wertvollen Werkzeug, mit dem cAMP-abhängige Signaltransduktionsprozesse in Nervengewebe studiert werden können.

Im Zuge einer anwendungsorientierten Optimierung von bPAC wurde gleichzeitig angestrebt, ein allgemeines Verständnis für die Funktion der BLUF-regulierten Adenylatzyklaste bPAC zu erhalten. Dazu wurden für die Photochemie und Signaltransduktion essentielle Aminosäure-Reste mutiert und sowohl die Aktivität der Varianten, als auch die der isolierten Zyklaste-Domäne bestimmt. In Abwesenheit der BLUF-Domänen verhält sich die bPAC-Zyklaste inaktiv. Ein Austausch photochemisch essentieller, sowie anderer signalleitender Reste führt zu einer erheblich gesteigerten Dunkelaktivität von bPAC

und einem Verlust der lichtabhängigen Regulationsfähigkeit des Enzyms. Substitutionen mit Einfluss auf die spektrale Lage von bPAC erhalten die Funktionalität bPACs. Die Anwesenheit der BLUF-Domänen ist demnach erforderlich, um die Zyklase zu aktivieren. Die intakte Beschaffenheit der BLUF-Domänen und des Kofaktor umgebenden Wasserstoffbrücken-Netzwerkes sind demnach Voraussetzungen für die Ausbildung des Photorezeptor-Grundzustandes und für die Signalweiterleitung in bPAC. Zusätzlich konnten zwei anwendungstechnisch interessante Varianten erhalten werden: bPAC-S27A, das eine besonders geringe Dunkelaktivität besitzt und sich speziell für Langzeitanwendungen eignet, und bPAC-Y7F, das eine invertierte Lichtabhängigkeit aufweist und unter kontinuierlicher Beleuchtung ein stabiles Flavin-Neutralradikal ausbildet. Diese Variante ist für tiefergehendes, funktionelles Verständnis von bPAC von Interesse und kann beispielsweise als intrazellulärer Radikalmarker eingesetzt werden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zyklisches Adenosinmonophosphat ist ein Botenstoff mit weitreichender physiologischer Bedeutung	1
1.2	Die Bildung von cAMP wird enzymatisch durch Adenylatzyklen verwirklicht	3
1.3	Optogenetik ist eine neue Methode zur Erforschung zellulärer Signaltransduktion	7
1.4	Photorezeptoren - die Werkzeugkiste der Optogenetik	9
1.5	Über die Blaublicht-Photorezeptorfamilie BLUF	15
1.6	Photoaktivierte Adenylatzyklen sind Vertreter der BLUF-Familie	22
1.6.1	Photoaktivierte Adenylatzyklen als Werkzeuge zur Manipulation zellulärer cAMP-Spiegel	23
1.6.2	Biophysikalische Untersuchungen an photoaktivierten Adenylatzyklen	25
1.7	Identifizierung von vier kleinen photoaktivierten Adenylatzyklen	26
1.8	Zielstellung der Arbeit	29
2	Ergebnisse	31
2.1	Funktionale Expression kleiner PACs	31
2.1.1	Kleine PACs aktivieren den cAMP-abhängigen Maltose-Stoffwechsel in <i>Escherichia coli</i>	32
2.1.2	Kleine PACs aktivieren cAMP-induzierte Membranströme in <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten	33
2.1.3	Kleine PACs aktivieren cAMP-vermittelte Lumineszenz in <i>Chinese-Hamster-Ovary</i> -Zellen	38
2.2	Charakterisierung kleiner PACs <i>in vitro</i>	42
2.2.1	Gewinnung rekombinanter PACs aus <i>Escherichia coli</i>	42
2.2.2	Spektroskopische Eigenschaften kleiner PACs	47
2.2.3	Photozyklus-Studie an nPAC76 und Thermostabilität	50

2.2.4	IR-spektroskopische Charakterisierung von bPAC und der bPAC BLUF-Domäne	54
2.2.5	Enzymaktivität kleiner PACs <i>in vitro</i>	56
2.3	Anwendungsrelevante Unterschiede zwischen bPAC und euPAC α	63
2.3.1	bPAC besitzt in <i>Xenopus</i> -Oozyten eine große dynamische Breite	64
2.3.2	bPAC zeigt in Ratten-Neuronen eine hohe lichtinduzierte cAMP-Produktion	65
2.3.3	bPAC besitzt im <i>Drosophila</i> -ZNS eine geringere Dunkelaktivität und erzielt lang anhaltende Effekte	68
2.4	Funktionelle Analyse und anwendungsbezogene Optimierung von bPAC	70
2.4.1	Zyklase-Aktivität erfordert die Anwesenheit der BLUF-Domänen	71
2.4.2	Einfluss ausgewählter Aminosäurereste auf die Aktivität von bPAC	72
3	Diskussion	79
3.1	Bewertung der Anwendungscharakteristika kleiner PACs	79
3.2	Bewertung der Enzymeigenschaften von bPAC <i>in vitro</i>	82
3.3	Gegenüberstellung der Anwendungsmerkmale von bPAC und euPAC α	84
3.4	bPAC im Vergleich mit optogenetischen Werkzeugen und cAMP-Stimulatoren	86
3.5	Bewertung der funktionellen Analyse von bPAC	89
3.5.1	Farbverschobene Varianten	91
3.5.2	Varianten mit Einfluss auf die Signaltransduktion und kinetische Varianten	93
3.5.3	Photozyklus-inaktive Varianten und radikalbildende Variante	96
3.6	Über die Signaltransduktion und Lichtregulation in bPAC	99
3.7	Perspektiven	101
4	Material und Methoden	107
4.1	Mikrobiologische Methoden und Säugerzellkultur	107
4.1.1	Mikrobiologische Methoden	107
4.1.2	Zellbiologische Methoden	110
4.2	Molekularbiologische Methoden	111
4.3	Proteinbiochemische Methoden	114
4.4	Spektroskopie	118
4.5	Elektrophysiologische Methoden	120
4.6	Bioinformatik	121

Anhang	123
0.1 Abkürzungen	123
0.2 Oligonukleotide	124
0.3 Spektroskopische Charakterisierung von bPAC-Y7F	125
0.4 Abhängigkeit der spezifischen Aktivität bPACs von den Testbe- dingungen	129
0.5 Einfluss von Mercaptoethanol auf die spezifische Aktivität bPACs	129
0.6 bPAC-vermittelte cAMP-Produktion in <i>Xenopus</i> -Oozyten	130
0.7 Größenausschlusschromatographie von nPAC76	130
Literaturverzeichnis	132
Danksagung	155

1 Einleitung

Wer kennt nicht die anregende Wirkung von Kaffee und Tee auf unseren Stoffwechsel, die Wahrnehmung verschiedenster Geruchsstoffe oder unsere Fähigkeit für Lernen und Erinnerung? Wer ist nicht auch mit den Krankheitssymptomen bakterieller Infektionen beispielsweise durch *Escherichia coli* oder *Bordetella pertussis* vertraut?

Alle diese Effekte haben eines gemeinsam: Sie beruhen auf der Wirkung von zyklischem Adenosinmonophosphat.

1.1 Zyklisches Adenosinmonophosphat ist ein Botenstoff mit weitreichender physiologischer Bedeutung

Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) ist ein weit verbreitetes biologisches Molekül, das als Botenstoff bei der zellulären Signaltransduktion eine bedeutende Rolle spielt (Abb. 1.1). Seit seiner Entdeckung durch Earl W. Sutherland im Jahre 1957 wurden cAMP-abhängige Stoffwechselwege und deren physiologische Bedeutung in vielen Organismen, von einfachen Bakterien bis hin zum Menschen, gefunden und erforscht. cAMP ist in diverse zelluläre Prozesse wie Genexpression, Metabolismus, Exozytose, Proliferation, Apoptose, Differentiation, Migration, Ionentransport oder pH-Regulation involviert [68, 87, 149].

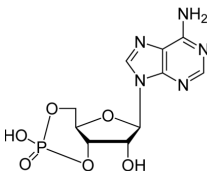
In niederen Organismen wie Bakterien, Pilzen oder Protisten dient cAMP im Wesentlichen der Einbindung externer Signale in zelluläre Stoffwechselabläufe. Ein cAMP-Anstieg zeigt dabei häufig Stress des Organismus an. So reguliert cAMP in Abhängigkeit verschiedener Umgebungsbedingungen (Nährstoff-Verfügbarkeit, Calcium- und CO₂-Konzentration) den Kohlenhydrat-Metabolismus, Sekretion, Virulenz und Biofilm-Produktion [68]. In Parasiten ist cAMP in den Transformations-Prozess zwischen verschiedenen Lebensstadien involviert [6]. Darüber hinaus besitzt cAMP auch Signal gebende Funktion als interzellulärer Botenstoff. Beispielsweise stellt cAMP-Sekretion in der Amöbe *Dictyostelium* die Kommunikationsbasis mit Umwelt und Artgenossen dar [74].

In Metazoen vermittelt cAMP insbesondere die Wirkung von Hormonen, Neurotransmittern oder Geruchsstoffen und kontrolliert physiologische Prozesse wie Geruchswahr-

1 Einleitung

nehmung, Glycogen-Abbau, Muskelrelaxation oder Lipidmetabolismus [40]. Speziell im Zentralnervensystem (ZNS) von Vertebraten und Invertebraten fördert cAMP durch vermehrte Bereitstellung von Neurotransmittern die Durchlässigkeit von Synapsen und reguliert damit Gehirnfunktionen wie Lernen und Erinnerung [17, 199]. Die primäre Wirkung der Adenosin-Analoga Koffein, Theophyllin und Theobromin geht auf die Aktivierung von Nervenzellen durch kompetitive Inhibierung von Adenosinrezeptoren zurück. Die Stimulation wird dabei durch cAMP-abhängige Signaltransduktionswege vermittelt. In höheren Dosen wirken diese Xanthine auch als Inhibitoren der cAMP-abbauenden Phosphodiesterasen [28].

A

Nc1ncnc2n(cnc12)[C@@H]3O[C@H](COP(=O)(O)O)[C@@H](O)[C@H]3O

B

cAMP-abhängiger Prozess	Dynamik	Interaktionspartner	Physiologische Bedeutung
Kationeneinstrom	Millisekunden	CNG-Kanäle	Geruchssinn
Genexpression	Minuten	CRP (CAP)	Metabolismus
Enzymaktivität, Genexpression (CREB), Aktivität von Kanälen (CFTR)	Sekunden bis Stunden	Proteinkinase A	Synaptische Plastizität, Regulation des vegetativen Nervensystems, Osmose
Aktivität kleiner GTPasen	Minuten bis Stunden	Guanine Exchange Factor (Epac)	Zellproliferation, Differenzierung, Aktivierung von Blutplättchen

Abbildung 1.1: cAMP und seine physiologische Bedeutung

A Der sekundäre Botenstoff cAMP besteht aus einer zyklisch veresterten Ribose mit angeknüpfter Purin-Base Adenin. **B** Tabellarische Übersicht über wichtige cAMP-Bindeproteine, cAMP-vermittelte Prozesse und deren Zeitverlauf. CNG (cyclic nucleotide gated), CRP (cAMP Receptor Protein) bzw. CAP (Catabolite Activator Protein), CREB (cAMP Response Element Binding Protein), CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator).

Als metabolische Schnittstelle zwischen mikrobiellen und höheren eukaryotischen Organismen sind cAMP-abhängige Signaltransduktionswege häufig Angriffspunkte von Humanpathogenen [104]. Mit dem Ziel, den Wertsstoffwechsel zu beeinflussen und die Besiedelung des Wirtes zu erleichtern, wird die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren moduliert, die Immunfunktionen des Wirtes umgangen und Krankheitssymptome werden ausgelöst. Bekannte Beispiele sind *Escherichia coli* (Erreger von Durchfallerkrankungen), *Mycobacterium tuberculosis* (Tuberkulose), *Bordetella pertussis* (Keuchhusten), *Vibrio cholerae* (Cholera) oder *Plasmodium* spp. (Malaria). In allen erwähnten Fällen geschieht die Einflussnahme entweder über das Anheben wirtseigener cAMP-Spiegel mittels Stimulation endogener Adenylatzyklasten (*V. cholerae*, *E. coli*), über Abgabe von Adenylatzyklase-Toxinen (*B. pertussis*, *V. cholerae*) oder über direkte Sekretion von

1.2 Die Bildung von cAMP wird enzymatisch durch Adenylatzyklasen verwirklicht

cAMP (*M. tuberculosis*).

Um solch unterschiedliche zelluläre Aufgaben erfüllen zu können, wird cAMP in Zellen höherer Organismen räumlich und zeitlich reguliert [20]. Innerhalb sogenannter Mikrodomänen z.B. Nukleus, Mitochondrien, Membran-Kompartimenten oder zytoplasmatischen Arealen kontrollieren Proteinkinasen und Phosphodiesterasen den cAMP-Spiegel lokal und autonom [197]. Eine weitere Form der Regulation ist die zeitliche Modulation von cAMP mittels pulsartiger oder oszillierender Muster. Im Unterschied zu kontinuierlich angehobenen cAMP-Niveaus werden dadurch andere Signaltransduktionswege angesprochen [48]. Physiologische cAMP-Spiegel im Zytosol tierischer Zellen liegen um $1\text{--}2\text{ }\mu\text{M}$. Dieser Wert kann im Rahmen der Signaltransduktion auf das 10-fache ansteigen, ist jedoch in den Kompartimenten geringer anzusiedeln [58, 134]. In Bakterien sind die intrazellulären cAMP-Konzentrationen mit $10\text{--}40\text{ }\mu\text{M}$ höher und hängen im Einzelnen von Umgebungsfaktoren ab [151].

Auf molekularer Ebene erfolgt die Vermittlung der Effekte über allosterische Interaktion mit cAMP-bindenden Proteinen (Abb. 1.1 B). Hauptinteraktionspartner in Prokaryoten ist das cAMP-Rezeptorprotein (CRP, cAMP-receptor protein oder CAP, catabolite activator protein). Bindung von cAMP an den Transkriptionsfaktor aktiviert die Expression verschiedener Gene. In Eukaryoten existieren mehrere Effektoren; Genexpression, Aktivität von Enzymen und Kanälen wird hier meist indirekt über Phosphorylierung durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A reguliert [40]. Weitere cAMP-aktivierte Proteine sind zyklisch-Nukleotid-bindende Kationenkanäle (CNG, cyclic nucleotide gated channels) und das cAMP-bindende GEF-Protein (GEF, Guanin Exchange Factor bzw. Epac, exchange proteins activated directly by cyclic AMP). Der Interaktionspartner bestimmt nicht nur den jeweiligen Effekt, sondern auch Komplexität, Zeitrahmen und Umfang seiner Wirkung.

1.2 Die Bildung von cAMP wird enzymatisch durch Adenylatzyklasen verwirklicht

Enzymatisch wird die Umwandlung von Adenosintriposphat (ATP) zu cAMP durch die Familie der Adenylatzyklasen (AC) katalysiert (siehe auch Abb. 1.3 A). Aufgrund der weitreichenden Bedeutung von cAMP kommen Adenylatzyklasen in nahezu allen Organismen in ein- oder mehrfacher Ausführung vor. Die Adenylatzyklasen sind mit unterschiedlichen regulatorischen Modulen verknüpft und ihre Aktivität wird entsprechend durch vielfältige Faktoren kontrolliert [87].

Generell können Adenylatzyklasen anhand ihrer Lokalisation in der Zelle eingeteilt wer-

1 Einleitung

den. Durch sequentielle Kopplung an Transmembrandomänen werden membranständige Adenylatzyklen gebildet, deren Aktivität oft nach Stimulation von G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPCR) durch GTP-bindende Proteine (G-Proteine) oder durch Calcium-Calmodulin reguliert wird. Membranständige Adenylatzyklen vermitteln daher vorrangig zelluläre Antworten auf extrazelluläre Stimuli wie Hormone oder Neurotransmitter [40]. Lösliche Adenylatzyklen dagegen sind G-Protein und Calmodulin insensitive und fungieren als intrazelluläre metabolische Sensoren. In Metazoen werden sie direkt durch Parameter wie pH-Wert [164], Calcium- [114] oder Bicarbonat-Ionen reguliert [18]. Um die lokale Differenzierung des zellulären cAMPs umzusetzen, liegen lösliche Adenylatzyklen in den verschiedenen intrazellulären Kompartimenten gemeinsam mit den cAMP-regulierten Proteinen vor [200].

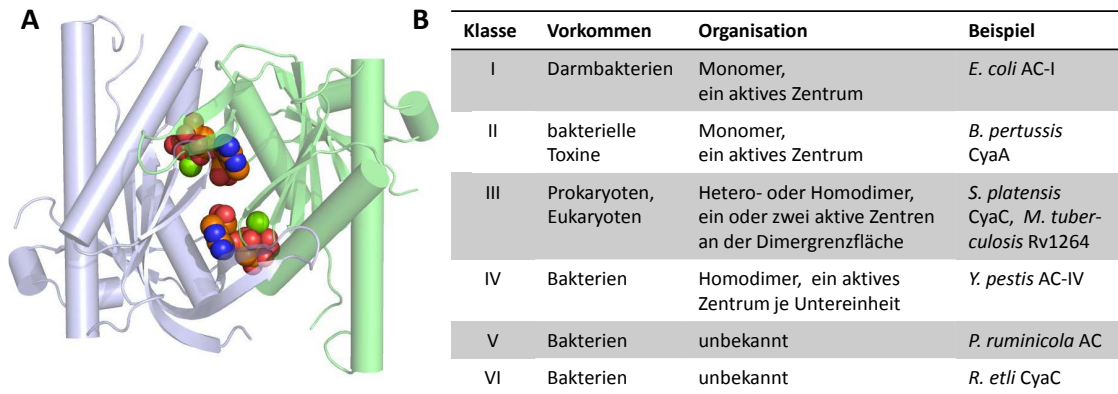


Abbildung 1.2: Domänenorganisation und allgemeine Merkmale von Adenylatzyklen

A In Klasse III Zyklen bilden sich an den Grenzflächen intermolekularer Dimere aktive Zentren aus. Die Bereitstellung der katalytisch essentiellen Reste erfolgt durch beide Untereinheiten komplementär. Klasse III Adenylatzyklen bakteriellen Ursprungs liegen als Homodimere mit zwei vollständig besetzten katalytischen Zentren vor. Die Abbildung zeigt die Struktur der cyanobakteriellen CyaC (1WC5) mit gebundenen Substratanaloga α,β -MethylenATP (orange) und Kofaktor Magnesium (grün). **B** Allgemeine Merkmale der Adenylatzyklen Klassen I-VI.

Gemeinsam haben alle Adenylatzyklen eine zytoplasmische, etwa 150 Aminosäuren umfassende Zykase-Domäne (CHD, Cyclase Homology Domain), die in mono- oder dimerer Form die Umgebung für die Substratumsetzung bereitstellt. Konservierte Reste in den aktiven Zentren nehmen funktionell essentielle Aufgaben wahr und stellen grundsätzliche Strukturmerkmale dar. Daneben unterscheiden sich Adenylatzyklen erheblich in Aufbau und Funktion [33]. Unabhängig von Domänen-Architektur werden Zyklen daher auf Basis von Sequenz und strukturellen Eigenschaften in sechs Klassen eingeteilt

1.2 Die Bildung von cAMP wird enzymatisch durch Adenylatzyklen verwirklicht

(Abb. 1.2 B) [21]:

Vertreter von Adenylatzyklen bakteriellen Ursprungs kommen in allen sechs Klassen vor; dabei umfassen die Klassen I, II, IV, V, und VI ausschließlich bakterielle Adenylatzyklen. Insofern sie bereits charakterisiert sind, handelt es sich um lösliche, regulierbare Zyklen in monomerer Form und mit einem aktiven Zentrum: Klasse I, Bsp. *E. coli* AC-1 wird durch Proteinkomponenten des Zuckertransportsystems kontrolliert [131], Klasse II, Bsp. AC-Toxine aus *B. pertussis* [80] oder *B. anthracis* [26] werden durch Calmodulin der Wirtszelle aktiviert. Klasse IV Zyklen dagegen sind als Dimere organisiert. Sie bilden je Untereinheit ein alleinstehendes, aktives Zentrum und besitzen keine regulatorischen Domänen oder allosterische Effektoren. Bsp. AC aus *Yersinia pestis* [33]. Kristallstrukturen sind für Vertreter der Klassen II, III und IV bekannt.

Die größte, diverseste und zugleich am besten charakterisierte Gruppe stellt die Klasse III der Adenylatzyklen dar. Enzyme dieser Klasse umfassen sowohl Adenylat- als auch die phylogenetisch nahe verwandten Guanylatzyklen und sind in Prokaryoten und Eukaryoten verbreitet [87]. Im Gegensatz zu allen anderen bilden Klasse III Adenylatzyklen funktionelle Dimere, an deren Kontaktfläche Reste beider Untereinheiten zur Ausbildung des katalytischen Zentrums beitragen. Während sich in Bakterien und Protozoen komplett besetzte Zyklus-Untereinheiten, gewöhnlich zu Homodimeren mit zwei aktiven Zentren formieren (Abb. 1.2 A oder Abb. 3.5 B), wird in Säugern das aktive Zentrum durch zwei verschiedene, im Gen aufeinander folgend angeordnete Untereinheiten gebildet, die jeweils nur einen Teil der essentiellen Reste enthalten. Da diese unvollständig besetzten Untereinheiten die katalytisch aktiven Aminosäuren auf komplementäre Weise zum gemeinsamen aktiven Zentrum beisteuern, entstehen Pseudoheterodimere mit einem katalytisch aktiven und einem regulatorischen Zentrum. Basierend auf strukturellen Motiven und regulatorischen Eigenschaften existiert eine weitere Unterteilung der Klasse III in 4 Subklassen (a. bis d.); die Zuordnung erfolgt jeweils aus dem Vergleich der Konsensussequenzen und anhand der Besetzung katalytischer Reste.

Auf der Grundlage von strukturellen Analysen wurde ein katalytischer Mechanismus vorgeschlagen, der zwei divalente Metall-Ionen als Kofaktoren in die Zyklisierungsreaktion miteinbezieht [162]. Dabei führen mindestens sechs kanonische Reste drei prinzipielle Funktionen aus (Abb. 1.3 B): (1.) An der Bindung und Koordination der Metall-Kofaktoren (physiologisch: Mg^{2+} , aber auch Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+}) sind zwei Aspartat-Reste beteiligt, welche gemeinsam das Substrat binden. (2.) ATP-Spezifität wird durch Interaktion eines Lysin-Aspartat (bzw. in Klasse IIIb Lysin-Threonin)-Paares mit der Purin-Base vermittelt. (3.) Ein Asparagin-Arginin-Paar ermöglichen schließlich die Stabilisierung des Übergangszustandes und γ -Phosphat-Bindung.

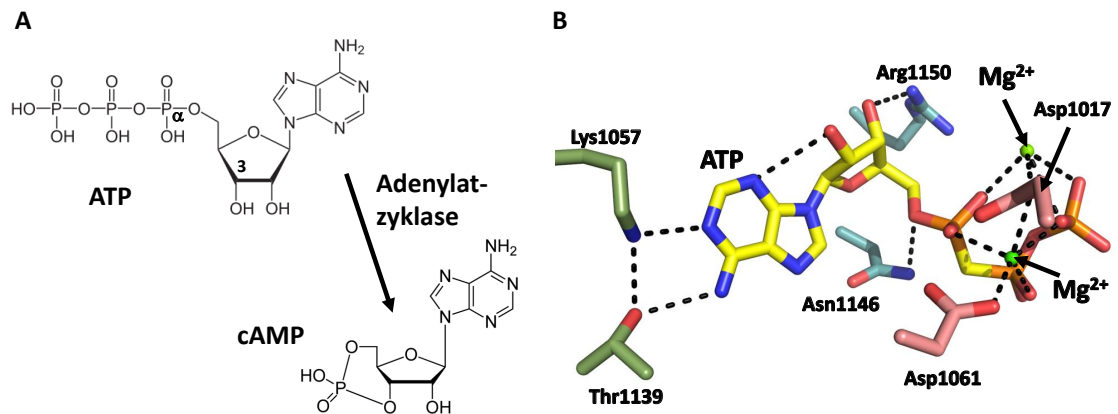


Abbildung 1.3: Enzymatische Katalyse durch Adenylatzyklen

A Adenylatzyklen sind Enzyme, die die Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) zu cAMP katalysieren. Die zyklische Veresterung wird durch einen Angriff der 3'-Hydroxygruppe der Ribose auf das α -Phosphat des ATPs initiiert und ist von der Abspaltung eines Pyrophosphates begleitet. **B** Substratbindung (α,β -MethylenATP, gelb) in Adenylatzyklen am Beispiel der CyaC (1WC5). Sechs konservierte Aminosäuren und zwei Metall-Kofaktoren sind an der enzymatischen Umsetzung beteiligt: Lysin-1057 und Threonin-1139 (dunkelgrün) interagieren mit dem Purinring der Base und sind für Substratbindung und -spezifität verantwortlich. An der Zyklisierung sind zwei Magnesium-Kofaktoren (hellgrün) beteiligt, die durch zwei Aspartat-Reste (Asp-1017 und 1061, rosa) koordiniert werden. Um den Übergangszustand energetisch zu stabilisieren, sind zwei weitere Reste (Asparagin-1046 und Arginin-1150, blau) in die Katalyse involviert.

Adenylatzyklen, sowie cAMP-abhängige Signaltransduktion sind aufgrund der universellen Natur des Botenstoffes und seiner medizinischen Relevanz Gegenstand aktueller Forschung. Eine Herangehensweise bei der Erforschung komplexer Signaltransduktionswege ist die gezielte Modulation beteiligter Komponenten. In der Neurobiologie kann beispielsweise eine Langzeitstimulation von synaptischer Aktivität (LTP, Long-term Potentiation) konventionell mittels chemischer Agenzien oder durch gezielte Elektro-Stimulation erfolgen [125]. Elektro-Stimulation ermöglicht eine zeitlich präzise Kontrolle des Membranpotenzials, erfordert jedoch das Einführen von Elektroden und erreicht meist nur einen Bruchteil der umliegenden Synapsen, deren Identifizierung zudem nicht einfach ist. Chemische Stimulation beruht auf der Beeinflussung von beteiligten biochemischen Prozessen und spricht eine große Anzahl von Synapsen an. Eine häufig angewendete Methode zur Induktion von LTP in neuronalen Gewebeschnitten ist die Applikation von Substanzen, die eine Anhebung des cAMP-Spiegels bewirken. Praktisch wird dies durch direkte Zugabe von cAMP-Analoga [93] oder pharmakologisch durch kombinierte Anregung endogener Adenylatzyklen und Inhibierung der Phosphodiester-

1.3 Optogenetik ist eine neue Methode zur Erforschung zellulärer Signaltransduktion

terasen über Forskolin/ Rolipram bzw. IBMX erzielt [17, 125]. Nachteile der genannten Verfahren sind teilweise geringe oder kurzlebige Effektivität, mangelnde Zellspezifität verbunden mit einer langsam einsetzenden Wirkung.

Um allgemein komplexe biochemische oder neuronale Netzwerke der Forschung zugänglicher zu machen, sind vorrangig Methoden erforderlich, die die spezifische Modulation einzelner Zellkomponenten und Parameter bei guter räumlich-zeitlicher Auflösung erlauben. Darüber hinaus ist eine möglichst nicht-invasive Herangehensweise wünschenswert.

1.3 Optogenetik ist eine neue Methode zur Erforschung zellulärer Signaltransduktion

Die junge Methode der Optogenetik bezeichnet den Einsatz von lichtaktivierbaren Proteinen als zellmanipulierende Werkzeuge. Dazu werden genetisch codierbare Photorezeptoren in Zellen eingebracht, um durch Applikation von Licht Zellantworten hervorzurufen (siehe Abbildung 1.4). Interessante Angriffspunkte der Einflussnahme sind zelluläre Faktoren wie das Membranpotenzial, Signalbotenstoffe (cAMP, cGMP, Calcium, Diacylglycerol oder Inositoltriphosphat), die Aktivität von Signalproteinen oder Prozesse wie Genexpression, Assemblierung des Zytoskeletts u.v.m. Im Vergleich zu den konventionell angewendeten Methoden bringt der optogenetische Ansatz einige Vorteile mit sich: Die Verwendung von gepulsten Laserquellen gewährleistet eine gute räumliche und zeitliche Kontrollierbarkeit der Anregung. Aufgrund der Eigenschaft von Licht Gewebe zu penetrieren, kann die Methode abhängig von der notwendigen Eindringtiefe nicht-invasiv erfolgen. Mittels zellspezifischer Promotoren kann eine selektive Expression der genetisch codierbaren Werkzeuge in definierten Zellen auch größerer Organismen erreicht werden. In Verbindung mit den unterschiedlichen Absorptionseigenschaften von Photorezeptoren ist eine Wellenlängen-spezifische Stimulation ausgewählter Zellpopulationen möglich. Photorezeptoren sind in zellulärer Umgebung stabil und wiederholt anregbar. Dies ist ein Vorteil gegenüber alternativen lichtgesteuerten Technologien z.B. dem photolytischen Freisetzen von Signalmolekülen aus photolabilen Verbindungen (*chemical uncaging*). Gleichzeitig ist die Bildung unerwünschter Nebenprodukte unwahrscheinlich. Den Durchbruch mit dieser Methode erzielten Hegemann und Mitarbeiter 2002, als sie lichtgesteuerte Ionenkanäle (Kanalrhodopsine) aus der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* heterolog in Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* exprimierten und mittels kurzer Lichtpulse deren Zellmembran depolarisierten [118]. Bereits 2005 gelang die erfolgreiche Übertragung dieses Prinzips auf Nervenzellen: Durch Anregung von Kanalrhodopsin-2 war das gezielte Auslösen von Aktionspotenzialen im Gewebsverband [13, 61] und dar-

1 Einleitung

über hinaus auch die Stimulation von Nervenzellen im lebenden Organismus möglich. Auf diese Weise konnte das motorische Verhalten von frei beweglichen Tiermodellen wie z.B. dem transparenten Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* oder von Ratten optisch beeinflusst werden [117, 169]. Des Weiteren hat die Methode aktuell auch in Primaten ihre erste, vielversprechende Anwendung gefunden [64].

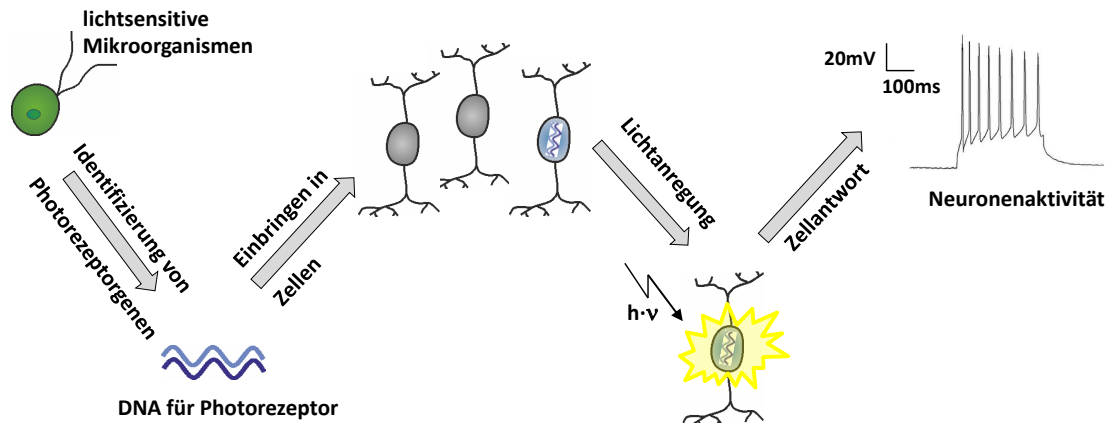


Abbildung 1.4: Das Prinzip der Optogenetik

Das Gen eines natürlichen oder synthetischen Photorezeptors wird in definierten Zellen zur Expression gebracht. Optische Anregung ermöglicht die Manipulation zellulärer Komponenten, beispielsweise das Auslösen neuronaler Aktivität oder die Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden.

2010 wurde Optogenetik zur Forschungsmethode des Jahres gewählt und erfährt gegenwärtig enormen Auftrieb. Die Anzahl und Arten an neuen und verbesserten optogenetischen Werkzeugen nimmt kontinuierlich zu. So ist es durch Kombination mit verschiedenen lichtaktivierbaren Ionenpumpen möglich, Neuronen selektiv und unter Verwendung unterschiedlicher Lichtfarben zu stimulieren und zu inhibieren [49, 198].

Neben Anwendungen in der Grundlagenforschung werden zunehmend auch therapeutisch relevante Ansätze verfolgt. Von besonderem Interesse ist die Behandlung degenerativer Augenerkrankungen, welche mit einem Funktionsverlust der Photorezeptorzellen einhergehen. Durch Einführen mikrobieller Rhodopsine in die Retina blinder Mäuse konnte deren Licht-Dunkel-Empfinden partiell wiederhergestellt werden [9, 15, 82]. Auf diese Weise gelang es auch, in der menschlichen Retina *ex vivo* die Reaktivität lichtinsensitiver Rezeptorzellen zurückzugewinnen. Darüber hinaus trägt optogenetische Forschung an Mäusehirnen auch zum Verständnis von sozialem Verhalten, Angst oder der Pathogenese von Erkrankungen wie z.B. Parkinson bei [43, 154, 169, 181, 191]. Medizinische Anwendungen am Menschen sind in Planung und werden derzeit in der klinischen Phase

II erprobt (pers. Kommunikation, JA. Sahel); für zukünftige Anwendungen werden u.a. effizientere Methoden der Gen-Zulieferung benötigt [165].

Während die Verwendung von Membrankanälen und -pumpen besonders für neurobiologische Anwendungen geeignet ist, können durch den Einsatz weiterer Photorezeptoren neue Forschungsfelder optogenetisch zugänglich gemacht werden. Von besonderem Interesse sind dabei lichtaktivierbare Enzyme wie z.B. natürliche Photorezeptor-Zyklasen, -Kinasen oder Transkriptionsfaktoren, sowie synthetische Rezeptor-Effektor- bzw. Rezeptor-Enzym-Kombinationen von beispielsweise GTPasen, Rekombinasen oder Proteasen, die es erlauben, zentrale Komponenten zellulärer Signaltransduktion anzusprechen und zu manipulieren. Forderungen für den erfolgreichen Einsatz eines Photorezeptors als optogenetisches Werkzeug sind: Der Photorezeptor sollte genetisch codierbar sein, er sollte wiederholt und in definierten zeitlichen und räumlichen Abfolgen an- und abschaltbar sein. Dazu sollten Photoaktivierung und Inaktivierung möglichst verzögerungsfrei erfolgen und keine Überlagerung mit anderen zellulären Prozessen bestehen. Vorteilhaft ist eine natürliche Verfügbarkeit des als Kofaktor benötigten lichtabsorbierenden Pigmentes.

1.4 Photorezeptoren - die Werkzeugkiste der Optogenetik

Das Sonnenlicht dient Pflanzen und anderen Photosynthese-betreibenden Organismen primär als Energiequelle. Daneben besitzt es informellen und oftmals wachstumsfördernden Charakter für nahezu alle lebendigen Organismen. Abhängig von Intensität und Wellenlänge kann Sonnenlicht aber auch schädigend wirken. Besonders kurzwellige UV-Strahlung hat das Potenzial, DNA-Defekte hervorzurufen oder zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zu führen. Für Lebewesen ist es daher essentiell, die Exposition im Licht balancieren zu können und dazu über photoprotektive Mechanismen zu verfügen. Um zwischen der im jeweiligen Habitat vorherrschenden Lichtqualität differenzieren zu können, beherbergen meisten Organismen ein oder mehrere Photorezeptoren.

Photorezeptoren sind Proteine, die durch den Einbau von Photopigmenten (Chromophore) zur „Lichtwahrnehmung“ befähigt sind. Aufgrund dieser Eigenschaft können sie Licht als Umweltstimulus in zelluläre Abläufe integrieren. Durch den Einbau unterschiedlich absorbierender Photopigmente decken Photorezeptoren den gesamten spektralen Bereich des Sonnenlichts ab und werden darauf basierend in sieben Familien eingeteilt (siehe Abbildung 1.5). In aquatischen Organismen dominieren beispielsweise aufgrund der größeren Eindringtiefe von kurzwelligem Licht Blaulicht-Rezeptoren: die Flavin-bindenden

1 Einleitung

Rezeptoren Cryptochrome, LOV (Light-Oxygen-Voltage)- und BLUF (Blue Light Using FAD)-Photorezeptoren, PYP (Photoactive Yellow Protein) und Rhodopsine. Pflanzen sind, bedingt durch ihre sessile Lebensform, in besonderem Maße auf differenzierte Lichtwahrnehmung angewiesen. Neben Rot- und Infrarotlicht-wahnehmenden Phytochromen nutzen sie auch UV-B Photorezeptoren (UVR8). Tiere und Menschen verwenden im Wesentlichen Rhodopsin- und Cryptochrom-basierte Photorezeptoren. Durch die Wahrnehmung der im Tagesverlauf wechselnden Lichtqualität und Intensität synchronisieren Photorezeptoren auch zeitliche Abläufe. Neben der Lichtqualität und Intensität können Photorezeptoren in Verbindung mit dreidimensionalen Superstrukturen die Lichtrichtung detektieren und tragen so zur räumlichen Orientierung des Organismus bei.

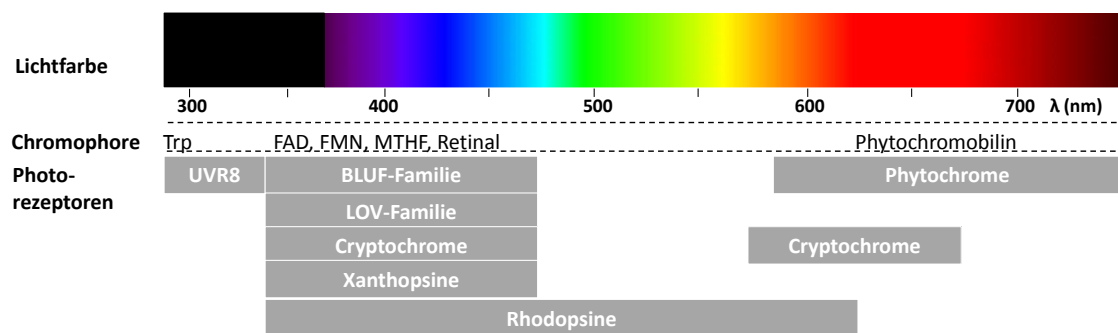


Abbildung 1.5: Lichtwahrnehmung natürlicher Photorezeptoren

Natürliche Photorezeptoren sind sieben Familien zugeordnet, die Licht über einen großen Spektralbereich wahrnehmen: UVB-Rezeptoren, Rhodopsine, Xanthopsine (Photoactive Yellow Protein, PYP), Phytochrome, Cryptochrome, LOV- und BLUF-Photorezeptoren. Zu diesem Zweck beherbergen die Proteine unterschiedlich absorbierende Chromophore: Tryptophan, Flavinadenindinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN), Methylentetrahydrofolat (MTHF), Retinal und Phytochromobilin. Der Absorptionsbereich eines Photorezeptors wird dabei durch den Chromophor bestimmt und durch die Proteinumgebung modifiziert. Abbildung nach Vorlage von [56] mit Erlaubnis von Elsevier.

Prominente Beispiele der Lichtwahrnehmung sind der Sehprozess des Auges durch visuelle Rhodopsine, die Anpassung an circadiane Rhythmik durch Melanopsine und Cryptochrome, die Vermittlung von Keimung, Wachstum und Blühen in Pflanzen durch Phototropine, Cryptochrome und Phytochrome oder die Steuerung von Virulenz und Sesshaftigkeit in pathogenen Bakterien durch BLUF-Photorezeptoren.

Um diese mannigfaltigen Aufgaben zu erfüllen, müssen Photorezeptoren das Ereignis der Lichtwahrnehmung zeitlich, sowie strukturell in biologische Information überführen. Lichtanregung löst in den meisten Photorezeptoren primär eine zyklische Abfolge photochemischer Reaktionen aus. Anregung führt demnach vorzugsweise zu einer für den

1.4 Photorezeptoren - die Werkzeugkiste der Optogenetik

Chromophor charakteristischen Photoisomerisierung oder Photoreduktion. Diese erste Photoreaktion hat oft die Ausbildung weiterer Übergangszustände zur Folge, welche strukturell oder in ihren Redoxeigenschaften veränderte Intermediate des Chromophors und der umgebenden Proteinmatrix darstellen. In vielen Fällen kommt es schließlich zur Ausbildung eines metastabilen Zustandes, der häufig die Funktion der biologisch aktiven Spezies hat und thermisch in den Grundzustand relaxiert. Während die Absorption der Photonen im femto-Sekundenbereich abläuft, erfolgt die Ausbildung des sogenannten Signalzustandes innerhalb von μs bis ms. Die Lebenszeit des Signalzustandes variiert dagegen auf einer Zeitskala von Millisekunden bis Minuten. Daneben existieren bistabile Zyklen, in denen zur Rückkehr in den Ausgangszustand ein zweiter Absorptionsschritt erforderlich ist. Die Dauer des Photozyklus ist maßgeblich für nachfolgende Prozesse und legt die für die Anwendung relevanten kinetischen Parameter fest.

Schnelle photochemische Ereignisse sind zunächst räumlich auf den Chromophor und die umgebende Proteinmatrix, dem sogenannten Sensor eines Photorezeptors, beschränkt. Dabei sind UV/vis-spektroskopisch detektierbare Photozyklusintermediate, sowie die Dynamik der Reaktionen für den jeweiligen Kofaktor und die Photorezeptorfamilie charakteristisch. Im Verlauf der Photoaktivierung pflanzt sich die Anregung in weiter entfernte Bereiche fort und bewirkt konformationelle Änderungen des Rezeptors, die mit biologischer Aktivität einhergehen. Um mithilfe der sieben verschiedenen Sensortypen möglichst viele biologische Prozesse ansprechen zu können, sind viele Photorezeptoren modular aufgebaut: Lichtsensor und Aktivitäts-vermittelnder Effektor sind in Form kombinierbarer Domänen organisiert (Abb. 1.6 B und C). Der Effektor kann dabei eine eigenständige, funktionale Proteineinheit z.B. eine Enzym-Domäne oder eine Schnittstelle für Wechselwirkung mit anderen Proteinen sein. Die modulare Organisation vieler Photorezeptoren setzt gemeinsame regulatorische Prinzipien innerhalb der Rezeptorfamilien voraus.

Allgemein können Photorezeptoren nach ihrer Zugehörigkeit zur Rezeptorfamilie, nach ihrer biologischen Funktion oder nach mechanistischen Aspekten eingeteilt werden. Um an dieser Stelle einen kurzen Überblick über hauptsächlich optogenetisch genutzte Photorezeptoren und deren Funktionsweise zu geben, wird eine im Folgenden grobe Gliederung nach funktionellen und Anwendungs-relevanten Gesichtspunkten vorgenommen.

Photorezeptoren zur Kontrolle des Membranpotenzials

Rhodopsine sind transmembrane Retinalbindeproteine, die in nahezu allen Organismen vorkommen und verschiedene Effektoren wie z.B. GPCRs, Histidin-Kinasen oder Ionen-

1 Einleitung

kanäle regulieren. Rhodopsin-basierte Photorezeptoren stellen die Mehrheit an Werkzeugen zur optischen Kontrolle des Membranpotenzials dar. In der Neurobiologie kommen hauptsächlich zwei Typen mikrobieller Rhodopsine zum Einsatz: Ionenkanäle und Ionenpumpen. Während der lichtaktivierbare Kationenkanal Kanalrhodopsin-2 (ChR2, Abb. 1.6 A) und seine Derivate eine Membrandepolarisation hervorrufen und so die neuronale Reizweiterleitung aktivieren [13], bewirken Ionenpumpen wie z.B. die Chloridpumpe Halorhodopsin aus *Natromonas pharaonis* oder die Protonenpumpe Arch3 eine Hyperpolarisation und Inhibierung der Nervenzellen [198]. Durch die kontinuierliche Entwicklung verbesserter und modifizierter Varianten stehen mittlerweile Kanalrhodopsine mit unterschiedlich starker Exprimierbarkeit [86, 177], Wellenlängenselektivität z.B. C1V1 [135] und Inaktivierungskinetik (SFO, ChETA) [8, 47] zur Verfügung und ermöglichen so eine repetitive und gezielte Steuerung der neuronalen Aktivität mit ms-Präzision. Kanalrhodopsine haben nur eine geringe Selektivität der geleiteten Ionen. Limitierend speziell in Hinblick auf den therapeutischen Einsatz im Auge ist eine durch die Absorptionseigenschaften des Retinals begrenzte Lichtsensitivität. Rhodopsin-basierte Photorezeptoren besitzen den Vorteil einer meist geringen Dunkelaktivität [19, 133]. Retinal ist in Säugerzellen natürlicherweise vorhanden, muss jedoch in anderen Anwendungen bereit gestellt werden.

Photorezeptoren, die Protein-Dimerisierung kontrollieren

Photorezeptor-vermittelte Dimerisierung zwischen Signalkomponenten ist ein unter anderem in Cryptochromen, Phytochromen und LOV-Proteinen verbreitetes Prinzip [89, 140]. Cryptochrome (CRY) sind Flavin-basierte Blaulichtrezeptoren, die in höheren Eukaryoten vorwiegend als lichtregulierte Transkriptionsfaktoren fungieren oder auch als Komponenten der zirkadianen Uhr unabhängig von Licht wirken [16]. 2010 nutzten Kennedy *et al.* die Fähigkeit von Cryptochromen zur lichtinduzierten Dimerisierung und entwickelten aus *AtCry2* und dem Interaktionspartner CIB1 (CRY-interagierendes bHLH 1) ein kombinierbares Dimerisierungsmodul CRY-CIB [70]. Das System erfordert keine exogenen Liganden und seine Aktivierungsdauer liegt im Subsekunden-Bereich. Durch die Anbindung von Enzym-Fragmenten oder einem Membrananker erhielten sie ein System, mit dessen Hilfe Funktionen wie Membrantargeting und DNA-Rekombination in Säugerzellen optisch realisiert werden konnten (Abb. 1.6 B). Darüber hinaus eignet sich das System zur Transkriptionskontrolle in Hefen und Zebrafischen [88].

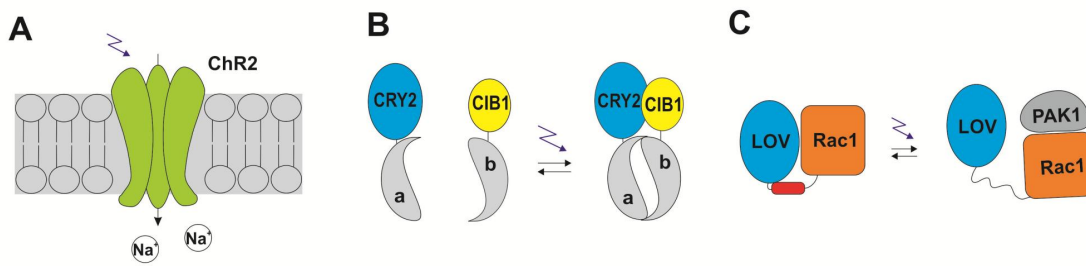


Abbildung 1.6: Optogenetische Anwendungen von Photorezeptoren

A Kanalrhodopsine (ChR) sind Werkzeuge zur lichtgetriebenen Membrandepolarisierung. **B** Optogenetische Dimerisierungssysteme auf Basis von Cryptochromen und Phytochromen. Lichtinduzierte Dimerisierung zwischen Photorezeptor und Interaktionspartner (CRY2 und CIB) vermittelt Aktivität der Fusionsproteine a und b bzw. Membrananbindung. **C** Optische Kontrolle der Aktivität in PYP- und LOV2-Fusionskonstrukten. Photoaktivierung von PA-Rac1 löst die sterische Inhibition und ermöglicht biologische Aktivität.

Nach gleichem Prinzip regulieren Phytochrome, die als lösliche Rot-Infrarotsensoren in Pflanzen, Pilzen, Algen, Cyanobakterien und Bakterien vorkommen, adaptive Prozesse wie z.B. lichtabhängige Entwicklung und Wachstum [140]. Anwendungen von Phytochrom-basierten Werkzeugen sind aufgrund ihrer Bistabilität, sowie ihrer Absorption im roten/infraroten Bereich interessant. Rotes Anregungslicht besitzt den Vorteil einer besseren Gewebepenetration bei gleichzeitig vermindertem Energiegehalt, und birgt damit ein geringes Schädigungspotenzial. Durch unterschiedliche Anregungswellenlängen kann der Wechsel zwischen zwei Aktivitätszuständen induziert werden. Bereits 2002 entwarfen Toettcher und Levskaja aus *AtPhy B* und dem Phytochrom-Interaktions-Partner PIF ein schaltbares Dimerisierungssystem. Indem sie Aktivatoren der Rho-GTPasen integrierten, konnte eine lokale Aktivierung des Aktinzytoskeletts und die Ausbreitung von Säugerzellen kontrolliert werden [84, 166]. Abhängig vom angesteuerten Prozess liegt die Zeitauflösung des Systems im Bereich von Sekunden bis Minuten. Phytochrom-basierte Systeme besitzen den Nachteil, dass in den meisten Zellsystemen der Kofaktor Phytochromobilin bereit gestellt werden muss. Aufgrund der Modularität beider Systeme sind vielfältige Anwendungsgebiete im Bereich lichtgesteuerte Proteindimerisierung denkbar.

Photorezeptoren, die Enzymaktivität oder Proteininteraktionen regulieren

Einen deutlichen Anteil an den für Optogenetik verfügbaren Photorezeptoren haben lichtaktivierbare Enzyme. Molekulare Grundlage für deren Funktion sind Konformationsänderungen spezifischer Strukturregionen nach Lichtanregung. Konkret beschrieben sind diese Mechanismen bei Mitgliedern der PAS-Familie (PAS, Per-ARNT-Sim).

1 Einleitung

Ein insbesondere in LOV-Proteinen (LOV, Light-Oxygen-Voltage) und in Proteinen der PYP-Familie (PYP, Photoactive Yellow Protein) umgesetztes Prinzip beruht auf Photoaktivierung durch lokales Freisetzen der Effektdomäne (Abb. 1.6 C) [50, 112, 189]. LOV-Photorezeptoren sind Flavin-bindende Blaulichtrezeptoren, die zumeist in Verbindung mit Kinasen oder DNA-Bindemotiven lichtabhängige Prozesse in Mikroorganismen und Pflanzen regulieren [91]. Ausgangspunkt für ein rationales wissenschaftliches Design synthetischer Rezeptoren ist speziell die LOV2-Domäne aus *Avena sativa* Phototropin-1: Aktivierung der Domäne geht mit lichtinduziertem Abkoppeln einer amphipathischen Helix, des sogenannten $J\alpha$ -Linkers, vom β -Gerüst des LOV-Kerns und deren anschließendem Entfalten einher [50, 189]. Das Lösen der sterischen Inhibierung korreliert mit der Initiierung der Effektoraktivität. Umgesetzt wurde dieser Mechanismus am Beispiel der photoaktivierbaren kleinen GTPase PA-Rac1 [185]. Kleine Rac-GTPasen sind ein zentrales Regulationselement bei der Aktinpolymerisation und der Zytoskelett-Umbildung [12]. Mithilfe PA-Rac1 gelang es Hahn und Mitarbeitern das Aktin-Zytoskelett optisch zu kontrollieren und somit die Beweglichkeit von Fibroblasten [185] oder von neutrophilen Granulozyten aus Zebrafisch-Embryonen [192] zu steuern.

Einem anderen regulatorischen Prinzip unterliegt die LOV-Domäne aus *Bacillus subtilis* YtvA. Lichtanregung der YtvA LOV-Domäne aktiviert nachgeschaltete Effektoren durch Verdrehung der α -helikalen *Linker*-Bereiche. Dieser Mechanismus wurde zum Design der synthetischen LOV-Histidin-Kinase YF1 herangezogen [109]. Eine weitere Strategie der Signalweiterleitung in LOV-Domänen beruht auf lichtinduzierter Dimerisierung. Diese Form der Photoaktivierung wird z.B. für den fungalen Photorezeptor Vivid aus *Neurospora crassa* angenommen [83, 201]. Neben den beschriebenen Formen C-terminaler Signaltransduktion können LOV-Domänen auch N-terminal angeordnete Effektdomänen regulieren. Die dabei zugrunde liegenden molekularen Prinzipien sind Gegenstand aktueller Forschung [108]. Beispiel für eine N-terminale Signalweiterleitung ist die bZIP-LOV Kombination (bZIP, basic region/leucin zipper) aus dem Blaulicht-abhängigen Transkriptionsfaktor Aureochrom [158].

Die Anwendungsgebiete lichtregulierter Enzyme sind durch ihr katalytisches Produkt bestimmt. Viele Enzyme und Transkriptionsfaktoren sind wegen ihrer Spezifität auf bestimmte Zellsysteme beschränkt. Wie alle Flavin-abhängigen Blaulichtrezeptoren besitzen LOV- und auch BLUF-basierte Systeme häufig eine nicht vernachlässigbare Dunkelaktivität und werden nach Anregung im Zeitbereich von Sekunden bis Minuten wieder inaktiv. Eine Kofaktorzugabe ist aufgrund der natürlichen Verfügbarkeit von Flavin nicht nötig.

Aus der BLUF-Photorezeptorfamilie sind bislang ausnahmslos photoaktivierbare Ade-

nylatzyklen (PAC) zum Einsatz gekommen. PACs sind lösliche Proteine, die aus Kombinationen von BLUF- und Zyklase-Domänen bestehen und in Gegenwart von Blaublicht den Signalbotenstoff cAMP bereitstellen. In mehreren Anwendungen wurde ihre lichtabhängige cAMP-Produktion genutzt, um die Durchlässigkeit von Synapsen und das Verhalten kleiner Tiere zu manipulieren. Da PACs Gegenstand dieser Arbeit sind, werden sie in Abschnitt 1.6 separat eingeführt.

Weitere Werkzeuge zur gezielten Modulation von cAMP sind Rhodopsin-basierte GPCR, die speziell an G α s-gekoppelt sind. Die cAMP-Produktion erfolgt hier durch die spezifische Aktivierung endogener Adenylatzyklen. Während Vertebraten-Rhodopsine mit Transducin, einem inhibitorischen G-Protein (G α i), assoziiert sind, kommen Invertebraten-Rhodopsine natürlicherweise in Verbindung mit stimulatorischen G α s-Proteinen vor. Im Einzelnen wurden das natürliche Opsin der Qualle *Carybdea rastonii* (JellyOP) und ein synthetischer, Rhodopsin-G α s-gekoppelter Rezeptor aus Vertebraten (Opto β_2 AR) genutzt, um cAMP und cAMP-abhängigen Signaltransduktionsprozesse anzusprechen [1, 4, 122].

1.5 Über die Blaublicht-Photorezeptorfamilie BLUF

Die Familie der BLUF-Photorezeptoren (BLUF, Blue Light Using FAD) wurden 2002 als dritte Gruppe Flavin-bindender Blaublicht-Rezeptoren identifiziert [39]. Diese Photorezeptoren sind vorrangig in prokaryotischen Organismen (Bakterien, Cyanobakterien) aber auch in Protisten wie z.B. *Euglena gracilis* [39, 91] verbreitet. Dort regulieren sie physiologische Prozesse wie Phototaxis, Biofilmbildung, Virulenz oder auch die Expression von Photosynthesegenen und sichern so das Überleben vieler Einzeller [37, 60, 115, 170].

BLUF-Photorezeptoren kommen in etwa 80 % aller bekannten Fälle als kurze BLUF-Proteine vor, und bestehen aus dem BLUF-Kern und einer 30-70 Aminosäuren langen C-terminalen Verlängerung mit unbekannter Funktion. Komplexe BLUF-Proteine enthalten eine N-terminal angeordnete BLUF-Domäne in Kombination mit verschiedenen Effektor-Domänen z.B. einer Häm-bindenden SCHIC-Domäne (Sensor Containing Heme Instead of Cobalamin), einer Nukleotid-degradierenden EAL-Domäne (benannt nach einer konservierten Sequenz) oder einer CHD-Domäne (Cyclase Homology Domain).

Prototyp der Familie ist das komplexe BLUF-Protein AppA aus dem photosynthetisierenden Schwefelbakterium *Rhodobacter sphaeroides*. AppA kombiniert eine N-terminalen BLUF- mit einer Sauerstoff-wahrnehmenden SCHIC-Domäne, gefolgt von einem C-terminalen Cystein-reichen Motiv [38, 113]. In *R. sphaeroides* fungiert AppA zugleich als

1 Einleitung

Blaulich- und Redox-Sensor und reguliert durch Interaktion mit dem Repressor PpsR die Expression von Photosynthese-Genen [105].

Ein BLUF-Protein mit ähnlicher Funktion ist der aus *E. coli* stammende Blaulicht-Sensor YcgF (BluF). YcgF enthält eine N-terminale BLUF- und eine degenerierte C-terminalen EAL-Domäne, die jedoch ihre Fähigkeit zur hydrolytischen Spaltung von c-di-GMP verloren hat. Stattdessen vermittelt sie die Bindung an den Transkriptionsrepressor YcgE. YcgF fungiert damit als Antirepressor, und reguliert über mehrere Signalkaskaden die Biofilm-Produktion von *E. coli* in blaulicht- und temperaturabhängiger Weise. YcgF trägt so zum Überleben des Darmbakteriums in einer Umgebung außerhalb des Wirtes bei [170, 171].

Ein weiterer prominenter Vertreter ist die BLUF-EAL-Domänen-Kombination BlrP1 aus dem pathogenen Keim *Klebsiella pneumoniae*. Diese durch Blaulicht gesteuerte Phosphodiesterase dient dem Abbau des bakteriellen Botenstoffs c-di-GMP, der wiederum Biofilmproduktion, Motilität und Virulenz des Erregers kontrolliert [37]. Für BlrP1 ist die erste Kristallstruktur der BLUF-Familie in Volllänge verfügbar [5]. Bekannt durch ihren Einsatz als zellmanipulierende Werkzeuge sind ebenfalls die der BLUF-Familie zugehörigen photoaktivierten Adenylatzyklasten (PAC, siehe Abschnitt 1.6).

In die Diskussion einzubeziehen sind daneben auch verschiedene kurze BLUF-Proteine wie Slr1694 (SyPixD) aus dem Cyanobakterium *Synechocystis sp.* PCC6803, Tll0078 (TePixD) aus *Thermococcus elongatus* BP-1, BlrB ebenfalls aus *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1, BlsA aus dem Humanpathogen *Acinetobacter baumannii* oder PapB aus *Rhodospseudomonas palustris*. Die Vermittlung der Aktivität erfolgt typischerweise durch Interaktionen über den C-terminalen Anhang mit anderen Signalkomponenten [138]. Die genannten BLUF-Vertreter sind in physiologische Prozesse wie Biofilmbildung (PapB, BlsA), Motilität (PapB), Virulenz (PapB) oder phototaktische Mobilität (PixD) involviert [69, 115, 124]. Im Falle von PapB erfolgt die Regulation lichtunabhängig [69].

Von allen kurzen BLUF-Proteinen wird Slr1694 aufgrund seiner bekannten Struktur, seiner Verfügbarkeit als rekombinantes Protein und wegen optimaler Photozykluseigenschaften als Modellobjekt für photochemische Untersuchungen herangezogen. Viele spektroskopische Studien, sowohl im Infrarot-als auch im UV/vis-Bereich [35, 52, 54, 99] und strukturelle Untersuchungen wurden an Slr1694 ausgeführt [194, 195, 196].

Gemeinsames Sensor-Modul aller BLUF-Photorezeptoren ist die kompakte, etwa 150 Aminosäuren umfassende BLUF-Domäne. Abb. 1.7 zeigt die Struktur am Beispiel von Slr1694. Allgemeine Strukturmerkmale dieser Ferredoxin ähnlichen $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta\beta$ -Bindungstasche sind ein zentrales, 5-strängiges β -Faltblatt mit zwei darüber liegenden α -Helices

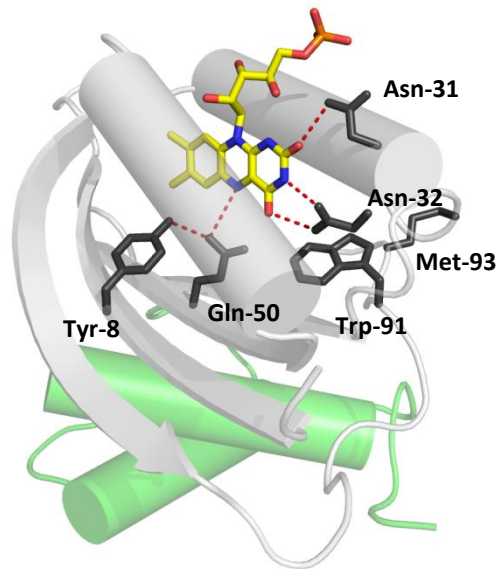


Abbildung 1.7: Struktur von Slr1694

BLUF-Domänen bestehen im Kern aus einem zentralen fünfsträngigen β -Faltblatt und zwei darüber angeordneten parallelen α -Helices (grau). Darin eingebettet ist der Flavin-Kofaktor (gelb), der mit Aminosäuren wie dem Tyrosin (Tyr-8), Asparagin (Asn-31 und -32), Glutamin (Gln-50), Tryptophan (Trp-91) und Methionin (Met-93) direkt oder über ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk in Wechselwirkung steht. Glutamin und Tyrosin haben wichtige Funktionen bei primären photochemischen Ereignissen. Tryptophan und Methionin sind eventuell in Signalweiterleitende Prozesse involviert. In Slr1694 (2HFN) schließt sich dem BLUF-Kern eine C-terminale Verlängerung aus zwei α -Helices an (grün), die allgemein auch als *Cap*-Helices bezeichnet werden.

[2, 5, 67, 66, 73, 194]. Dazwischen ist der Kofaktor positioniert, den die umgebenden Aminosäuren, darunter ein hochkonserviertes Tyrosin (Tyr-8) und Glutamin (Gln-50) über ein extensives Wasserstoffbrückennetzwerk einbinden.

Photoaktivierung in BLUF-Photorezeptoren basiert auf Protonen gekoppeltem Elektronentransfer

Im Gegensatz zu Photorezeptoren mit isomerisierbaren Kofaktoren wie den Rhodopsinen oder Phytochromen, besitzen Flavin-bindende Photorezeptoren einen Kofaktor, der nur geringe strukturellen Änderungen ausführen kann. Photoaktivierung von Cryptochromen, LOV- und BLUF-Photorezeptoren beruht daher auf subtilen photochemischen Mechanismen, deren Nachweis oft herausfordernd ist. Während in Cryptochromen Redoxreaktionen des Kofaktors das entscheidende Ereignis darstellen, resultiert Lichtanregung von LOV-Domänen in die Ausbildung eines kovalenten Flavin-Cysteinyll-Adduktes [92].

1 Einleitung

Spektroskopisches Charakteristikum aller BLUF-Photorezeptoren ist die Entstehung eines Photozyklus-Intermediates, das sich im sichtbaren Bereich durch eine 10-15 nm Rotverschiebung der Flavin-Absorption auszeichnet und als Signalzustand betrachtet wird [32, 35, 36, 63, 66, 76, 96, 136]. FTIR- und Raman-spektroskopische Untersuchungen an AppA [97, 175] und Slr1694 [52, 99] ergaben, dass die Ausbildung des Signalzustandes mit einer Schwächung (16 cm^{-1} Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen) der $\text{C}_4=\text{O}$ und/oder $\text{C}_2=\text{O}$ Steckschwingung des Flavins einhergeht. Kern des daraus abgeleiteten Photoaktivierungsmodells ist eine lichtgetriggerte Umgestaltung des Chromophor-nahen Wasserstoffbrücken-Netzwerkes [97, 123, 175].

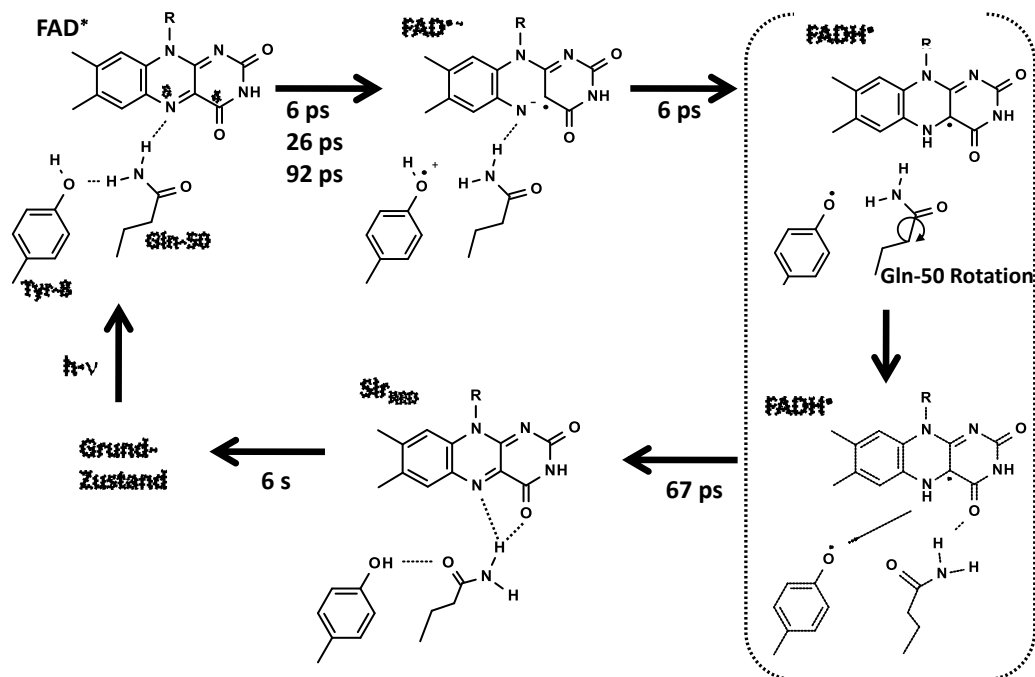


Abbildung 1.8: Photoaktivierung in BLUF-Domänen nach Gauden *et al.* und Bonetti *et al.* [10, 35]

Am Beispiel von Slr1694 postulieren Gauden *et al.* folgenden Photoaktivierungsmechanismus: Das nach Anregung erhaltene angeregte Flavin FAD^* wird durch Übertragung eines Elektrons vom konservierten Tyrosin (Tyr-8) unter Bildung eines Radikalpaares deaktiviert. Die nachfolgende Protonierung des anionischen Flavinradikals $\text{FAD}^{\bullet-}$ führt zur Bildung des neutralen Flavinradikals FADH^{\bullet} und zum Aufbruch der Chromophor-nahen Wechselwirkungen. Dies ermöglicht eine Neuorientierung des Wasserstoffbrücken-Netzwerkes begleitet von einer 180° -Rotation des konservierten Glutamins (Gln-50). In Folge der Radikalpaar-Rekombination bildet sich das rotverschobene Intermediat Slr_{red} aus. Die Photoaktivierung ereignet innerhalb von etwa 70 ps, dagegen läuft der thermische Zerfall in einem Zeitrahmen von mehreren Sekunden ab. Nachgedruckt aus [10] mit Erlaubnis von Elsevier.

In weitergehenden Untersuchungen wurde dieses Modell bestätigt und verfeinert. Aufgrund struktureller Analysen an der AppA-BLUF Domäne postulierten Anderson *et al.* die lichtinduzierte Umorientierung des Netzwerkes unter Einbeziehung einer 180° Rotation des konservierten Glutamins [2]. In ultraschnellen spektroskopischen Messungen an Slr1694 gelang Gauden *et al.* die Auflösung zweier weiterer Photozyklus-Intermediate, die eine Radikal-Paar-Bildung als Mechanismus der Photoaktivierung in BLUF-Domänen zu Grunde legen [35]. Überdies ermöglichten Untersuchungen an redox-modulierten Slr1694-Varianten die experimentelle Beschreibung eines neuen Ladungstransfer-Komplexes aus dem angeregten Zustand [102]. Demnach führt lichtgetriebener Elektronentransfer von einem konservierten Tyrosin auf das angeregte Flavin und nachfolgende Kofaktor-Protonierung zu der sukzessiven Bildung eines anionischen Semichinonradikals, eines neutralen Semichinonradikals und schließlich zur Ausbildung des rotverschobenen Intermediates (Abb. 1.8). Nach allgemeiner Vorstellung ist das konservierte Tyrosin im Grundzustand durch eine Wasserstoffbrücke über die Amidgruppe des Glutamins mit den N₅-Stickstoff des Flavins verbunden. Der lichtinduzierte Elektronen- und Protonentransfer vermindert die Tyrosin-Glutamin-Wechselwirkung und gibt im Zuge einer Radikalpaar-Rekombination dem Glutamin die Möglichkeit der Neuausbildung von Wasserstoffbrücken mit der C₄=O Gruppe und dem N₅ des Flavins [2, 10, 35]. Speziell die Ausbildung der Wasserstoffbrücke zum Flavin C₄=O liefert den entscheidenden Beitrag zum spektralen *Shift*. Der Signalzustand zerfällt thermisch in einem für jede BLUF-Domäne typischen Zeitrahmen, der Sekunden bis Minuten umfasst.

Trotz dieser grundlegenden Vorstellung der photochemischen Mechanismen in BLUF-Domänen ist die Natur des Wasserstoffbrücken-Netzwerkes, seine Ausdehnung und seine lichtabhängige Umorientierung unzureichend verstanden. Dies ist insbesondere in Differenzen bestehender BLUF-Kristallstrukturen und deren Zuordnung zu licht- und dunkeladaptierten Zuständen begründet [2, 66, 67, 194]. Die aktuelle Forschung befasst daher sich u.a. mit Aufklärung mechanistischer Details des BLUF-Photozyklus und den experimentellen Nachweisen für die zugeordneten Funktionen involvierter Aminosäuren. Die Beteiligung des konservierten Tyrosins und Glutamins an primären photochemischen Abläufen und deren Funktion als primärer Elektronendonator [10] bzw. bei der Ausbildung des rotverschobenen Intermediates wurde in verschiedenen BLUF-Domänen gezeigt [76, 77, 174]. Zweideutigkeiten in Bezug auf die genaue Position und Orientierung zum Flavin bestehen für das konservierte Glutamin, für ein semikonserviertes Tryptophan und ein konserviertes Methionin. Mehrere Modelle betrachten die 180°-Rotation des Glutamins als Schlüsselereignis bei der Photoaktivierung, sehen aber die Anbindung des umgebenden Wasserstoffbrücken-Netzwerk an Tryptophan [2, 25, 35, 45, 174] oder Me-

thionin [67, 121] als essentiell an. Alternativ wurde auf Basis theoretischer Berechnungen eine Glutamin-Tautomerisierung mit oder ohne anschließender Rotation vorgeschlagen [22, 143].

Signalweiterleitung in BLUF-Photorezeptoren verläuft über C-terminale Helices

Die Position von Tryptophan und Methionin an der Verknüpfungsstelle zwischen Kofaktor und Proteinmatrix machen diese beiden Reste zu potenziellen Trägern intramolekularer Signalweiterleitung. In diesem Zusammenhang wurde ein funktionelles lichtinduziertes Umklappen beider Aminosäuren diskutiert [24, 67, 173]. Neuere Untersuchungen in AppA kommen zu dem Ergebnis, dass Tryptophan keine funktionell wirksame Positionsänderung durchläuft, sondern in BLUF-Domänen verschiedene Orientierungen annehmen kann [176]. Speziell in AppA konnte zudem ein alternativer Elektronentransfer von Tryptophan auf das angeregte Flavin nachgewiesen werden [34, 78]. Dem gegenüber ist Methionin ein in BLUF-Domänen hoch konservierter Rest, der als Teil flexibler Strukturelemente ebenfalls lichtabhängige Bewegungen ausführt [67]. Eine signalvermittelnde Funktion Methionins ist daher wahrscheinlich. Seine kritische Bedeutung für die Photoaktivierung wurde am Beispiel von Slr1694 gezeigt [100]. Es ist allerdings zu bedenken, dass intramolekulare Signaltransduktionswege innerhalb der BLUF-Familie voneinander abweichen können.

Strukturellen Vorgänge, die die Signalweiterleitung im Protein jenseits der unmittelbaren Kofaktorumgebung beschreiben und zur Realisierung biologischer Aktivität führen, sind in BLUF-Domänen bislang weitestgehend unbekannt. Die Veröffentlichung der BlrP1-Kristallstruktur und die spektroskopischen und biochemischen Arbeiten an verschiedenen BLUF-Proteinen haben allerdings zu der Entwicklung eines allgemeinen Signaltransduktions-Konzeptes geführt. Die grundlegende Struktur des BLUF-Kerns ist innerhalb der Rezeptor-Familie identisch. Verschiedene Studien zeigen, dass Lichtanregung mit einer vergrößerten Beweglichkeit des $\beta 5$ -Faltblattes, sowie der $\beta 4/\beta 5$ -Schleife verbunden ist [67, 183, 184, 194]. Deutliche Unterschiede gibt es in der Ausrichtung der anschließenden C-terminalen α -Helices. Während die sogenannten *Cap*-Helices in Slr1694, BlrB und Tll0078 senkrecht zu den beiden N-terminalen Helices angeordnet sind, haben die Helices in BlrP1 und nach Berechnung in PapB eine parallele Anordnung (Abb. 1.9) [5, 69, 194]. Vor diesem Hintergrund gelang es Ren *et al.* durch den Austausch der *Cap*-Helices Slr1694 in ein funktionales PapB-Protein zu überführen [138]. Darüber hinaus leiten Arbeiten an YcgF, BlrB und Slr1694 zu der Annahme, dass die Signaltransduktion über die *Cap*-Helices $\alpha 3$ und $\alpha 4$ voranschreitet [53, 54, 147, 184, 195]. Anhand von strukturellen Untersuchungen an der BlrP1-BLUF Domäne postulierten Wu und

Kollegen, dass sich der Signaltransduktionsprozess über konformelle Änderungen der $\beta 4/\beta 5$ -Schleife, des $\beta 5$ -Faltblattes bis in 15 Å entfernte Bereiche ($\alpha 3/\alpha 4$ -Schleife) des *Caps* fortpflanzt [183]. Der Vorgang hat damit Ähnlichkeit mit der $J\alpha$ -vermittelten Signaltransduktion in LOV-Domänen. Diese experimentellen Befunde werden durch Ergebnisse von Molekulardynamik-Simulationen an BlrP1 gestützt [71].

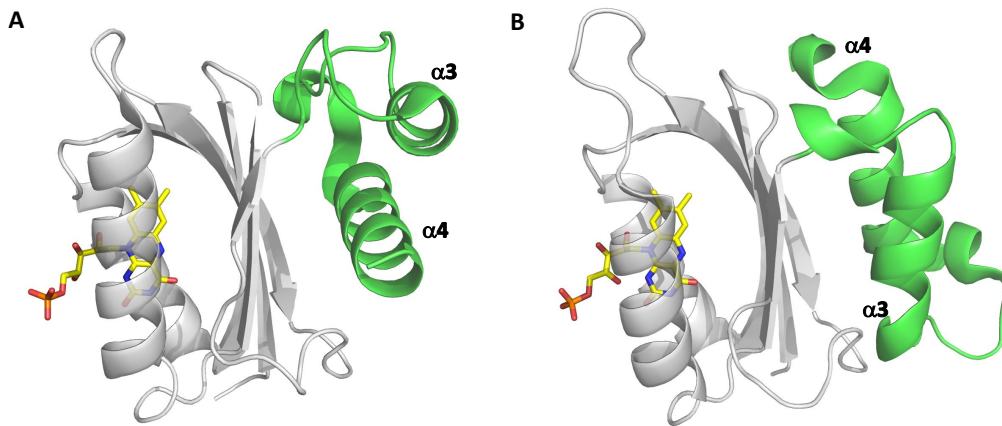


Abbildung 1.9: Anordnung der C-terminalen Helices in den Strukturen von Slr1694 und BlrP1

BLUF-Domänen besitzen die gleiche Kernstruktur (grau). Die C-terminalen Helices $\alpha 3$ und $\alpha 4$ (*Cap*-Helices, in grün) sind in **A** Slr1694 (2HFN) und **B** BlrP1 (3GFY) senkrecht bzw. parallel zu den N-terminalen Helices angeordnet.

Neue Aspekte zum Oligomerisierungsverhalten kurzer BLUF-Proteine liefern biochemische Untersuchungen an Slr1694 (PixD) und seinem Zielprotein [161]. Im Dunkeln bildet es zusammen mit seinem Interaktionspartner PixE einen Komplex, bestehend aus zwei gestapelten 5-er Ringen Slr1694 und fünf PixE Molekülen [195]. Nach Belichtung zerfällt der Komplex in PixE Monomere und Slr1694 Dimere. Die Dissoziation wird auf Konformationsänderungen am $\beta 5$ -Faltblatt und an der $\beta 4/\beta 5$ -Schleife zurückgeführt und ist nicht-linear mit der Lichtintensität korreliert [100, 159, 195, 196]. Mehrfachanregung unterdrückt die Dissoziation des Komplexes. Slr1694 kann damit möglicherweise Intensität des Lichtes „wahrnehmen“ [160].

1.6 Photoaktivierte Adenylatzyklen sind Vertreter der BLUF-Familie

Photoaktivierte Adenylatzyklen (PAC) sind überwiegend aus einer Gruppe begeißelter Augentierchen, den Euglenoiden, bekannt [75]. Insgesamt wurden 7 PAC-Homologe in photosynthetisch aktiven, aber auch photosynthetisch nicht aktiven *Euglena*-Arten identifiziert. Im Zuge der Erforschung von Lichtwahrnehmung und Phototaxis in *Euglena gracilis* berichteten Wolken und Mitarbeiter erstmals, dass der *Euglena* Photorezeptor- auch Paraflagellarer-Körper (PFB, Abb. 1.10 B) genannt- die Form eines natürlichen 3-dimensionalen Kristalls besitzt [132, 182]. Anhand von Phototaxis-Aktionsspektren und der charakteristischen grünen PFB-Autofluoreszenz vermuteten sie bereits 1977 die Anwesenheit eines Flavoproteins als photoperzeptives Pigment [182].

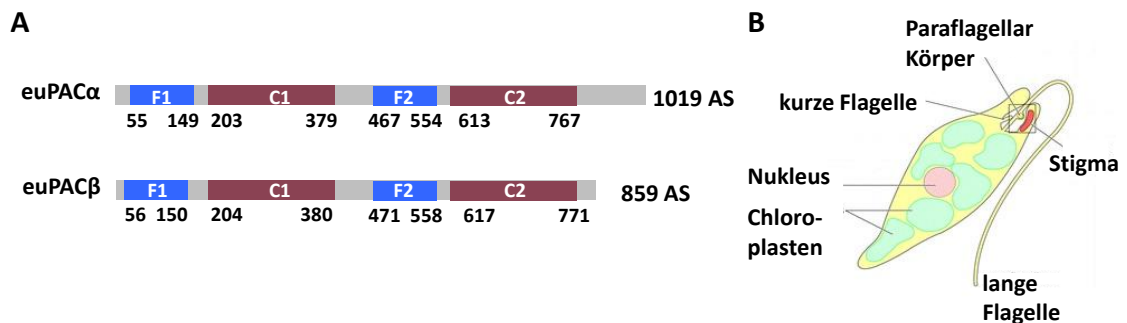


Abbildung 1.10: Aufbau und Lokalisation des *Euglena gracilis* Photorezeptors euPAC

A Der Photorezeptor euPAC besteht aus je zwei Untereinheiten euPAC α und euPAC β mit 1019 bzw. 859 Aminosäuren Länge. Jede Untereinheit enthält zwei BLUF- (F1/F2) und zwei Adenylatzyklase-Domänen (C1/C2) in alternierender Anordnung. **B** Schematischer Aufbau von *Euglena gracilis*. *Euglena* besitzt an der Basis ihrer Flagelle eine Schwellung in Form eines paraflagellaren Körpers. Dieses lichtwahrnehmende Organell hat eine kristalline Struktur und enthält den Photorezeptor euPAC. Nachgedruckt aus [55] mit Genehmigung von John Wiley & Sons.

Erst 25 Jahre später gelang Iseki und Mitarbeitern die Isolierung der ersten PAC aus dem PFB und ihre biochemische Charakterisierung [60]. euPAC ist ein heterotetramerer Proteinkomplex bestehend aus je zwei löslichen PAC-Untereinheiten euPAC α (105 kDa) und euPAC β (90 kDa). euPAC α und euPAC β sind homolog und enthalten zwei FAD-bindende BLUF- und zwei Zyklase-Domänen in alternierender Anordnung F1-C1-F2-C2 (Abb. 1.10 A). Der gesamte Komplex weist eine geringe, aber signifikante Adenylatzyklase-Aktivität im Dunkeln auf. Im Licht steigt diese auf den 80-fachen Wert an. Die Abhängigkeit von der Substrat-Konzentration folgt einer Michaelis-Menten-Kinetik mit einer maximalen Umsatzgeschwindigkeit $v_{max} \approx 3500 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ und

1.6 Photoaktivierte Adenylatzyklen sind Vertreter der BLUF-Familie

einer Michaelis-Menten-Konstante von $K_M \approx 0.5 \mu\text{M}$. In einer weiteren Studie untersuchten Yoshikawa und Kollegen das Aktivitätsverhalten von isoliertem euPAC nach Belichtung. Die PAC-Aktivität nahm unter nicht-sättigenden Bedingungen linear mit der Lichtintensität und Belichtungsdauer zu. Intermittierende Bestrahlung bei konstanter Lichtdosis, aber variierender Belichtungsdauer (0.1-180 s) bewirkt keine Aktivitätssteigerung mit zunehmender Frequenz. Dies legt nahe, dass die Enzymaktivierung im Wesentlichen auf die Belichtungszeit beschränkt ist. Das Abklingen der Aktivität im Dunkel muss daher innerhalb von 0.1 s erfolgen [193].

Indem Iseki *et al.* die PAC-Expression mittels RNA-vermittelter Interferenz unterdrückten, zeigten sie weiter, dass euPAC als Hauptbestandteil des PFBs in *Euglena* speziell für die photophobe Reaktion (Taubelbewegung nach plötzlicher Lichtänderung) nach Anstieg der Lichtintensität verantwortlich ist [60, 193]. Später konnte darüber hinaus eine Beteiligung von euPAC an positiver sowie negativer Phototaxis nachgewiesen werden [120]. Nach Isekis Annahme reguliert euPAC die Motilität der Flagellen. Dies wird untermauert von Befunden, dass euPAC ausschließlich im PFB oder entlang der gesamten Flagelle lokalisiert ist [119].

1.6.1 Photoaktivierte Adenylatzyklen als Werkzeuge zur Manipulation zellulärer cAMP-Spiegel

Nur 4 Jahre nach der Entdeckung von euPAC α und euPAC β berichten Schröder-Lang *et al.* über ihren erstmaligen Einsatz als zellmanipulierende Werkzeuge [145]. In Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* wiesen sie die unabhängige Funktionalität beider Untereinheiten nach: In Kombination mit cAMP-aktivierbaren Ionenkanälen (CNG-Kanäle) konnten durch kurze Lichtpulse schnelle und reversible Ionenströme ausgelöst werden. Im Vergleich besaß euPAC α eine 100-fach größere lichtaktivierte cAMP-Produktion als euPAC β . Funktionale Expression zeigte euPAC α auch in embryonalen Nierenzellen (HEK293) und im Zentralnervensystem der Fliege *Drosophila melanogaster*. In *Drosophila* gelang es insbesondere Blaulicht induzierte Verhaltensänderungen wie Hyperaktivität und Schreckstarre hervorzurufen und damit die Eignung speziell von euPAC α für optogenetische Zwecke zu demonstrieren.

Die euPACs aus *E. gracilis* stellen somit die ersten Werkzeuge zur optischen Kontrolle von cAMP dar. Infolgedessen wurde die Übertragbarkeit des Ansatzes auf verschiedenen Zellsystemen erprobt. In sensorischen Neuronen der Meeresschnecke *Aplysia* bewirkt cAMP-Injektion eine vorübergehende Modulation der Aktionspotenziale hinsichtlich ihrer Höhe und Breite; dies wird physiologisch mit einer verstärkten synaptischen Transmission auf nachfolgende Motorneurone in Verbindung gebracht [116]. Indem sie isoliertes

1 Einleitung

euPAC oder einen euPAC-Expressionsvektor in sensorische Neurone einbrachten, gelang es Nagahama und Kollegen vergleichbare, cAMP-abhängige Effekte durch Applikation von Blaulicht zu induzieren und so die Anwendbarkeit von euPAC zu belegen [116]. Dennoch stellen ihre Größe und ihr komplexer Aufbau anwendungstechnisch einen Nachteil gegenüber euPAC α dar.

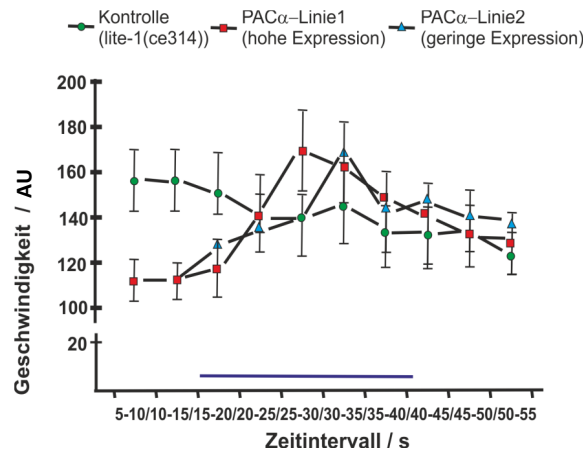


Abbildung 1.11: Lichtinduzierte Adenylatzyklaseaktivität von euPAC α in *C.elegans* [179]

Einfluss auf die Kriechgeschwindigkeit von *C.elegans* nach Photoaktivierung von euPAC α aus Weissenberger *et al.* [179]. Während die Geschwindigkeit der Kontrollwürmer (grüne Kreise) im Licht unverändert bleibt, steigt diese in der euPAC α -Linie 1 mit hohem Expressionsspiegel (rote Quadrate) und in der euPAC α -Linie 2 mit geringerem Expressionsspiegel (blaue Dreiecke) an. Das verminderte Ausgangsniveau in den transgenen Tieren kann auf eine Kompensation der Dunkelaktivität von euPAC α zurückzuführen sein. Abbildung abgedruckt mit Erlaubnis von John Wiley & Sons.

Bis heute wurde daher ausschließlich euPAC α in weiteren Tiermodellen zur Anwendung gebracht. Bucher *et al.* exprimierten euPAC α in Motorneuronen von *Drosophila*-Larven und analysierten deren Aktivierungseffekte auf die neuromuskuläre Synapse. Unter Belichtung gelang es ihnen eine signifikante Verstärkung der synaptischen Übertragungsfrequenz zu erzielen, welche ebenso in Folge von erhöhten präsynaptischen cAMP-Spiegeln beobachtet wurde [14]. Auch in euPAC α -exprimierenden Motorneuronen des transparenten Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* bewirkte Photoaktivierung eine Steigerung der Neurotransmitterausschüttung und der synaptischen Aktivität. Auf physiologischer Ebene konnten Weissenberger und Kollegen dadurch eine Beschleunigung der Schwimmfrequenz, sowie der Bewegungsfähigkeit und der Bewegungsmuster in *C.elegans* hervorrufen (Abb. 1.11). Das Ausmaß der lichtabhängigen Verhaltensän-

derungen variierte mit der euPAC α -Expressionsstärke. Im Vergleich zu Kanalrhodopsin sind die durch euPAC α erzielbaren Lichteffekte jedoch als gering einzuordnen [179]. Zudem wird die basale Aktivität euPAC α s in einem gegenüber der Kontrolle abweichenden Dunkelverhalten der Tiere deutlich. Diese Nachteile spiegeln sich in einer stagnierenden Anzahl an veröffentlichten euPAC α -Anwendungen wider.

1.6.2 Biophysikalische Untersuchungen an photoaktivierten Adenylatzyklen

Aufgrund der beträchtlichen Länge der euPAC α - und euPAC β -Gene und der begrenzten Löslichkeit ihrer Genprodukte konnte rekombinantes Volllängen-PAC bislang nicht erhalten werden. Eine weitere Charakterisierung der Untereinheiten hinsichtlich ihrer Tertiärstruktur, der funktionalen Bedeutung von F1- und F2-Domäne oder mechanistischer Prinzipien kann daher nur indirekt erfolgen. Die Signaltransduktion verläuft in einem großen Protein mit vielen Domänen erwartungsgemäß komplex. In einer Mutations-Funktions-Studie an *Xenopus*-Oozyten, die euPAC α und CNG-Kanäle exprimieren, beschrieben Looser *et al.*, dass die Inaktivierung der F1-Domäne durch Substitution des essentiellen Tyrosins eine gesteigerte Dunkelaktivität und einen Verlust der Lichtaktivierung zur Folge hat. Demgegenüber zeigt die entsprechend F2-inaktivierte euPAC α -Variante ein dem Wildtyp ähnliches Verhalten; diese Befunde belegen die dominante Bedeutung der F1-Domäne an der Lichtaktivierung von euPAC α [90]. Während darüber hinaus auch die Expression von C1- oder C2-inaktivierten euPAC α -Varianten die Lichtstimulation der Zykaseaktivität verhindert, kann die Funktionalität durch Koexpression beider inaktiver Varianten wiederhergestellt werden. Dies legt nahe, dass sich die aktiven Zentren von euPAC α durch intermolekulare Dimerisierung von C1- und C2-Domäne bilden.

Spektroskopische Untersuchungen an euPACs konnten wegen unzureichender Materialverfügbarkeit bislang nicht vorgenommen werden. Allerdings gelang es Ito und Kollegen, sowohl die isolierte euPAC α F1-, euPAC α F2- als auch die euPAC β F2-Domäne in löslicher Form aus *E. coli* aufzureinigen und ihre spektroskopischen Eigenschaften zu vergleichen. Während die F1-Domäne keine Kofaktorbindung zeigte, konnte für euPAC α F2 und euPAC β F2 BLUF-typisches Photozyklusverhalten mit einer Quantenausbeute des Signalzustandes von $\Phi_S \approx 0.3$ bzw. 0.07 und einer Dunkelrelaxation von HWZ ≈ 40 s bzw. 4 s nachgewiesen werden [62, 63]. Mutation des konservierten Glutamins und Tyrosins verhindern, wie in anderen BLUF-Domänen, die Ausbildung des rotverschobenen Intermediates in euPAC α F2 [63]. Das ungleiche Photozyklusverhalten von euPAC α F2 und euPAC β F2 ist besonders vor dem Hintergrund ihrer 67 %-igen Sequenzidentität inter-

1 Einleitung

essant. Ein strukturelles Merkmal von euPAC α F2 ist die Abwesenheit des semikonservierten Tryptophans, das in BLUF-Domänen nicht-produktiven Elektronentransfer auf das angeregte Flavin ausführen kann. Ein Ersetzen des Tryptophans in euPAC β F2 durch das in euPAC α F2 vorhandene Leucin führt zu einer Steigerung der Quantenausbeute des Signalzustandes [62].

Nach ersten erfolgreichen Anwendungen von euPAC α ist Bedarf an einer PAC mit verbesserten Anwendungseigenschaften entstanden. Um die Optimierung einer PAC zielgerichtet ausführen zu können, müssen Funktionalität und molekulare Signaltransduktion der Photorezeptoren genauer erforscht werden. Dafür notwendige spektroskopische und kristallographische Analysen setzen eine Bereitstellung von rekombinantem PAC in ausreichender Menge und Qualität voraus.

1.7 Identifizierung von vier kleinen photoaktivierten Adenylatzyklasen

Auf der Suche nach neuen PACs waren zunächst Prof. A. Losi (Universität Parma) und Prof. W. Gärtner (MPI Mühlheim) im Genom des filamentösen Bakteriums *Beggiatoa* erfolgreich. *Beggiatoa* ist ein Sulfid oxidierendes Bakterium und besiedelt in Form von Matten aerob-anaerobe Grenzschichten an Gewässergründen (Abb. 1.12 B). Es besitzt einen vielseitigen Stoffwechsel und kann bei der aeroben Sulfid-Oxidation Sauerstoff, bei der anaeroben Oxidation intern gespeichertes Nitrat als Elektronenakzeptor nutzen [106]. Die identifizierte DNA-Sequenz (Abb. 1.12 A) codiert vermutlich ein 350 Aminosäuren langes Protein (ZP_01999737), das eine N-terminale BLUF-Domäne (im Kern ca. 100 AS) und eine C-terminale Zykase-Domäne (173 AS) enthält. Beide Domänen sind über einen ca. 50 Aminosäuren langen *Linker* miteinander verbunden.

Drei weitere potenzielle PACs wurden in Zusammenarbeit mit S. Kateriya (Universität Neu Delhi) in der Genomsequenz des Amoeboflagellaten *Naegleria gruberi* gefunden. *Naegleria* ist ein freilebender Protist, der in drei verschiedenen Lebensstadien existieren kann: der Dauerzyste, dem Flagellaten (Abb. 1.12 C) und der vorherrschenden Lebensform, der Amöbe [30]. Aufgrund seines nahe verwandten Humanpathogens *Naegleria fowleri* und seiner schnellen Differenzierung von der Amöben zur Flagellaten-Form, die mit einer *de novo* Biosynthese des kompletten Zytoskeletts binnen 1.5 Stunden einher geht, ist *N. gruberi* Gegenstand der Forschung.

Die PACs sind: nPAC76 (XP_002674372, 390 AS), nPAC35 (XP_002672444), 392 AS)

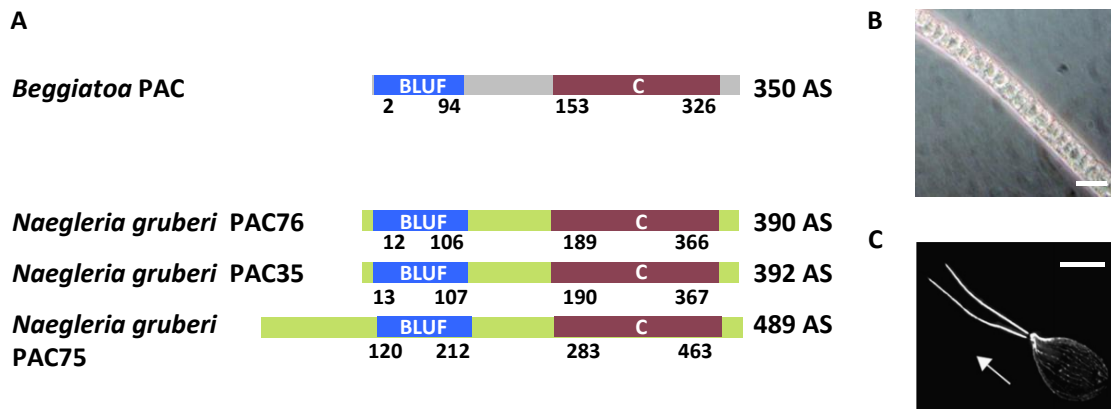


Abbildung 1.12: Domänen-Organisation kleiner PACs und Ursprungsorganismen

A Strukturelle Eigenschaften von bPAC (grau) und nPACs (grün) mit BLUF-Photosensor- (blau) und katalytischer Zyklase-Domäne (C, rot). Die Zahlen geben die Aminosäure-Positionen wieder. **B** *Beggiatoa* ist ein Sulfid oxidierendes Bakterium, das sich mikroskopisch durch sein filamentöses Erscheinen und seine charakteristischen Schwefeleinlagerungen auszeichnet [57]. © 2007 American Society for Microbiology. **C** *Naegleria* ist ein in Erde und Frischwasser lebender Amoeboflagellat. Die Abbildung zeigt *Naegleria* in Flagellatenform [29]. Das Zytoskelett ist durch Antikörper angefärbt. Der Pfeil indiziert die Schwimmrichtung. © 2011 Institut Pasteur. Veröffentlicht durch Elsevier Masson SAS. Der Maßstab entspricht in **B** 10 μm und in **C** 20 μm .

und nPAC75 (XP_002674371, 489 AS). Alle drei verfügen über eine homologe Domänen-Anordnung, unterscheiden sich jedoch in der Größe der N-terminalen Anhänge und der *Linker*-Länge von bPAC (Abb. 1.12 A).

Für die Anwendung ist interessant, dass die Gesamtgröße aller vier BLUF-Zyklen weniger als der Hälfte der Größe klassischer euPACs aus *Euglena* und Verwandten entspricht. Zudem zeichnen sich die kleinen PACs durch ihre einfache Domänen-Architektur aus. Die Primärstrukturen der bakteriellen bPAC und der eukaryotischen nPACs weisen eine Identität von 23 % auf (bPAC und nPAC76). Speziell die Sequenzen von nPAC76 und nPAC35 sind zu 79 % identisch.

Die Genomsequenz von *Naegleria* enthielt darüber hinaus die Sequenz für eine weitere, vierte PAC. Da diese PAC eine Kombination aus nPAC75 und nPAC76 darstellt, wurde sie nicht in diese Arbeit einbezogen.

Ein Sequenzvergleich der kleinen PACs mit anderen BLUF-Domänen (Abbildung 1.13 A) zeigt, dass Positionen konservierter, sowie photochemisch essentieller Reste in bPAC und nPACs äquivalent besetzt sind. Auch in den Zyklase-Domänen sind Metall-koordinierende, Substrat-bindende und den Übergangszustand stabilisierende Aminosäuren vollständig vorhanden (Abbildung 1.13 B). Die Präsenz wichtiger struktureller Motive in beiden

1 Einleitung

konservierten Domänen lässt vermuten, dass alle vier PACs funktionelle Genprodukte ergeben.

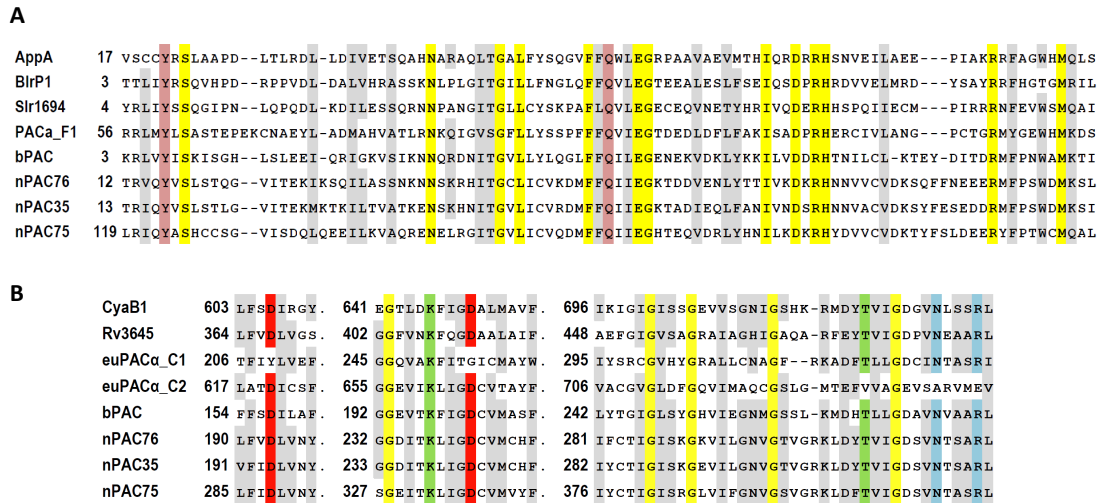


Abbildung 1.13: Aminosäure-Sequenz-Alignments kleiner PACs

A Sequenzvergleich von BLUF-Domänen kleiner PACs mit homologen Bereichen aus AppA aus *Rhodobacter sphaeroides*, BlrP1 aus *Klebsiella pneumoniae*, Slr1694 aus *Synechocystis* sp. PCC6803 und der euPACα F1-Domäne aus *Euglena gracilis*. **B** Partielles Sequenz-Alignment der katalytischen Domänen kleiner PACs mit Klasse IIIb Zyklase-Domänen aus CyaB1 aus *Anabaena* sp., Rv3645 aus *Mycobacterium tuberculosis* sowie die euPACα C1- und C2-Domänen aus *Euglena gracilis*. Farblich hervorgehoben sind konservierte Reste in gelb, teilweise konservierte Reste in grau, zusätzlich in A für den Photozyklus essentielle Reste (dunkelrot) sowie in B in blau Asparagin und Arginin, die den Übergangszustand stabilisieren, Substrat-Spezifität definierendes Lysin und Threonin (grün), sowie zwei Metall-koordinierende Aspartate (rot) [157, 163, 188].

Auf der Grundlage des Polymorphismus einiger Schlüssel-Reste in Klasse III Zyklassen lassen sich weitere Zuordnungen vornehmen. Insbesondere das Vorhandensein eines Lysin- und eines Threonin-Restes an Substrat-spezifischen Positionen machen die Funktion der PACs als Adenylatzyklen wahrscheinlich [87]. Ein charakteristisches Strukturmerkmal für Gruppe der IIIb Zyklen ist die Substitution des Substrat-bindenden Aspartats durch Threonin und erlaubt die Klassifizierung der vier gefundenen PACs. Aufgrund der mit anderen prokaryotischen Adenylatzyklen der Klasse IIIb übereinstimmenden strukturellen Eigenschaften, kann von einer funktionellen Anordnung als Homodimer mit zwei katalytischen Zentren ausgegangen werden (siehe Abbildung 3.5).

1.8 Zielstellung der Arbeit

Optogenetik ist eine neue biotechnologische Methode und ein beständig wachsendes Forschungsfeld. Um die Methode einerseits auf neue Gebiete wie z.B. Kontrolle von zellulären Signalkaskaden anwenden zu können, und andererseits die Funktionalität der optogenetischen Werkzeuge an die spezifischen Anforderungen der Anwender anzupassen, müssen neue zellmanipulierende Werkzeuge entwickelt und bereits bestehende optimiert werden. Relevante Gesichtspunkte sind dabei z.B. Wellenlängen selektive Anregbarkeit, die Spezifität oder zeitliche Kontrollierbarkeit der Werkzeuge.

Zyklisches Adenosin-Monophosphat ist aufgrund seiner weiten biologischen Verbreitung und seiner physiologischen Bedeutung als sekundärer Botenstoff ein wichtiger Angriffspunkt für die Kontrolle zellulärer Signalkaskaden. Die Möglichkeit, zelluläre cAMP-Spiegel optisch zu kontrollieren, wurde durch den Einsatz der lichtaktivierbaren Adenylatzyklasten euPAC α und euPAC β erfolgreich demonstriert. Jedoch sind Wirkungsgrad der Enzyme und die dynamische Lichtaktivierbarkeit gering. Darüber hinaus steht die Erforschung von Struktur-Funktionsbeziehungen noch am Anfang.

Mit dem Ziel verbesserte optogenetische Werkzeuge zur Kontrolle zellulärer cAMP-Spiegel zur Verfügung zu stellen, sollten vier neu identifizierte, mikrobielle PACs auf ihre Eignung als zellmanipulierende Werkzeuge untersucht werden. Daraus leiteten sich folgende Schwerpunkte der Arbeit ab: Im ersten Schritt war ihre Funktion als lichtaktivierbare Adenylatzyklasten nachzuweisen und ihre Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* vergleichen. Für den Nachweis *in vitro* musste zunächst an der Herstellung von rekombinantem PAC gearbeitet und eine geeignete Nukleotid-Analysemethode etabliert werden. Für die Demonstration der funktionellen Expression waren unterschiedliche Zellbasierte Funktionsassays zu etablieren, die eine vergleichende Bewertung der PACs hinsichtlich anwendungstechnisch relevanter Enzymparameter ermöglichten. Im nächsten Schritt sollte die PAC mit dem größten Anwendungspotenzial einer genaueren Charakterisierung unterzogen und in Kooperation mit anderen Forschungseinrichtungen eine funktionelle Analyse insbesondere im Vergleich mit euPAC α ausgeführt werden. Ziel war die Bewertung und Abgrenzung des Anwendungspotenzials beider Proteine. Die Intention des zweiten Teils der Arbeit bestand darin, das grundlegende Verständnis für die Funktion und die Lichtregulation einer PAC zu vertiefen. Dazu sollte durch gezielte Mutagenese die Bedeutung spezifischer Aminosäuren innerhalb von BLUF-Domäne und deren Auswirkung auf das Enzymverhalten untersucht. Dies wurde insbesondere unter dem Gesichtspunkt einer anwendungsorientierten Optimierung an der PAC mit den besten Anwendungseigenschaften vorgenommen.

2 Ergebnisse

Für die Untersuchung der vier neu identifizierten kleinen PACs wurden die codierenden DNA-Sequenzen als synthetische Konstrukte in human Codon adaptierter Version bei Mr.Gene (Regensburg) erworben (Genbank-Einträge: bPAC GU461306, nPAC76 JF928492, nPAC35 JX967006). Für prokaryotische Anwendungen wurde bPAC zusätzlich in *E. coli* adaptierter Form (GU461307) erhalten.

2.1 Funktionale Expression kleiner PACs

Um die Funktionalität und die Eignung der vier kleinen PACs für optogenetische Anwendung nachzuweisen, wurden zunächst Funktionstests in verschiedenen Zellsystemen ausgeführt. Die Quantifizierung der lichtinduzierten cAMP-Produktion kann dabei über den Nachweis von cAMP direkt erfolgen. Die direkte Beobachtung und Bestimmung zeitlich veränderlicher cAMP-Spiegel ist im zellulären Kontext jedoch gerade dann nicht einfach zu realisieren, wenn diese gleichzeitig optisch kontrolliert werden: Methoden wie immunologische oder radiometrische cAMP-Assays stellen Endpunktmessungen dar und erlauben es nicht, den cAMP-Verlauf in intakten Zellen nachzuvollziehen. Dagegen basieren gängige Methoden zur Echtzeit-Bestimmung von cAMP auf fluoreszierenden FRET-Reportern, die aufgrund geringer Signalstärke als *Ratio*-Messung durchgeführt werden müssen. Dies führt häufig aufgrund überlappender Excitationsspektren zur gleichzeitigen Anregung von Reporter und Photorezeptor. Alternativ stehen verschiedene indirekte Bestimmungsmethoden zur Verfügung, die auf der Detektion nachgeschalteter, cAMP-regulierter Vorgänge beruhen. Die Kopplung des Signals an natürliche cAMP-Effektoren liefert zwar nur mittelbare und eventuell modifizierte Antworten, geben aber gleichzeitig auch Auskunft über die Eignung potenzieller optogenetischer Werkzeuge zur Steuerung nachgeschalteter Signaltransduktionsvorgänge. Entsprechend wichtig sind Funktionstests, mit denen Prozesse *in vivo* charakterisiert werden können.

2.1.1 Kleine PACs aktivieren den cAMP-abhängigen Maltose-Stoffwechsel in *Escherichia coli*

In einem ersten Schritt wurde die Funktionalität der vier potenziellen photoaktivierten Adenylatzyklasten in einem einfachen bakteriellen Reporter-Gen-Assay auf MacConkey-Agar getestet. Dieser Test ist mit molekularbiologischen Standardtechniken durchführbar. Die Produktion von funktionalen Adenylatzyklasten führt zu einem selektierbaren Phänotyp.

In *E. coli* wird die Expression von Enzymen zur Verwertung alternativer Kohlenhydrate wie z.B. Maltose durch den cAMP-abhängigen Transkriptionsaktivator CRP (CAP) reguliert (siehe Abb. 1.1). Unter Glukosemangelbedingungen bewirkt ein Anstieg der cAMP-Konzentration die Aktivierung der Genexpression von Enzymen, die zur Fermentation von Maltose benötigt werden. Auf MacConkey-Agar wird dieser Prozess, der mit der Entstehung saurerer Stoffwechselprodukte verbunden ist, durch den enthaltenen pH-Indikator rot angezeigt; ausfallende Gallensalze trüben zusätzlich die Umgebung ein. Ein Adenylatzyklase-defizienter Stamm kann aufgrund des Mangels an cAMP den zur Maltose-Fermentation führenden Stoffwechselweg nicht nutzen. Bakterien dieses Stammes produzieren basische Abbauprodukte und bilden auf MacConkey-Agar kleine helle Kolonien.

Zur Demonstration der Zyklaste-Aktivität wurden die Gene der vier PACs in dem Adenylatzyklase-defizienten *E. coli*-Stamm BTH101 unter Weißlicht exprimiert und im Vergleich mit dem untransformierten Stamm auf MacConkey-Agar ausgestrichen. Die Auswertung erfolgte nach 16 Stunden und ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Platten, die parallel im Dunkeln behandelt wurden, zeigten dazu optisch keine Unterschiede (nicht dargestellt). Für die Expression wurden die pET-SUMO-Konstrukte (siehe Kapitel 2.2.1) verwendet.

Die Expression von bPAC und nPAC35 hat eine kräftige Rotfärbung der *E. coli*-Zellen zur Folge (Abbildung 2.1 A und D) und zeigt die Aktivierung des Maltose-Stoffwechsels durch die beiden Zyklasten an. Demzufolge können bPAC und nPAC35 den cAMP-Mangel kompensieren; beide Adenylatzyklasten sind daher funktionell. Abweichend davon zeigen nPAC75- und nPAC76-exprimierende Zellen nur einen schwachen bzw. keinen Farbumschlag gegenüber der Negativkontrolle (Abbildung 2.1 A, B und C). Dies deutet auf eine geringe Aktivität von nPAC75 bezüglich des Assays hin. Die Zyklaste-Aktivität von nPAC76, sowie die Lichtaktivierung von bPAC, nPAC35 und nPAC75 kann unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht nachgewiesen werden.

Im Falle von nPAC76 könnte der negative Phänotyp durch ein unfunktionelles, aber auch durch ein unlösliches Protein oder durch unzureichend aktives Genprodukt hervorgeru-

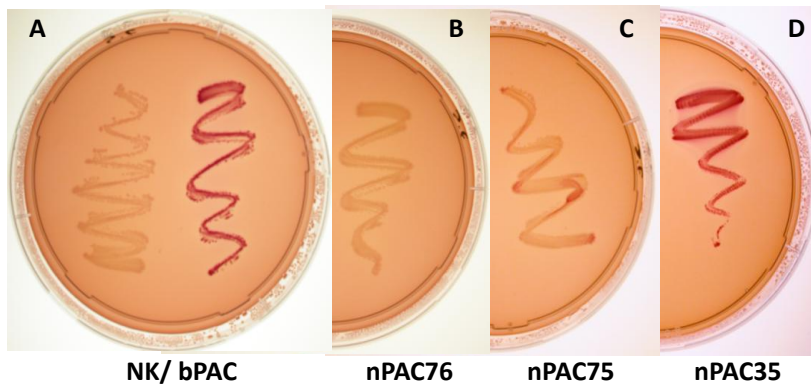


Abbildung 2.1: Bakterieller PAC-Funktionstest auf MacConkey-Agar

Die Aktivität der vier kleinen PACs wurde auf MacConkey-Agar plus Maltose in dem Adenylatzyklase-defizienten *E. coli*-Stamm BTH101 getestet. Die Agar-Platten zeigen BTH101-Zellen untransfiziert (A linke Hälfte, Negativkontrolle), sowie nach Expression von bPAC (A rechts), nPAC76 (B), nPAC75 (C) und nPAC35 (D) im Licht. Eine Rotfärbung der Kolonien zeigt cAMP induzierte Maltose-Fermentation an. Abbildung A wurde ursprünglich in [156] publiziert. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

fen werden. Mögliche Ursachen für die nicht nachgewiesene Lichtaktivierung von bPAC, nPAC35 und nPAC75 stellen konstitutive Zykase-Aktivität, jedoch auch eine basale Aktivität der PACs dar, die in Verbindung mit dem starken T7-Expressionssystem bereits im Dunkel zum Tragen kommt.

Nachdem so die grundlegende Adenylatzyklase-Aktivität von bPAC, nPAC35 und nPAC 75 belegt wurde, wird im nächsten Schritt eine mögliche Lichtaktivierung der Zykassen untersucht.

2.1.2 Kleine PACs aktivieren cAMP-induzierte Membranströme in *Xenopus laevis*-Oozyten

Ein Funktionstest, der die gleichzeitig variable Expression von PAC und einem cAMP-Sensor sowie die zeitaufgelöste Detektion der cAMP-vermittelten Antworten erlaubt, ist der elektrophysiologische Assay in Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis*. Aufgrund seiner eukaryotischen Natur besitzt er größere Anwendungsrelevanz. Das Prinzip des Assays beruht auf der Verwendung von cAMP-aktivierbaren Kationenkanälen (CNG-Kanälen), die neben PAC in den Oozyten zur Expression gebracht werden. Lichtabhängige cAMP-Produktion kann daher indirekt über den Zeitverlauf der Membranleitfähigkeit nachvollzogen werden (Abb. 2.2 A) [145].

Um eine hohe cAMP-Empfindlichkeit sowie Spezifität des Assays zu erreichen, wurde eine mutierte olfaktorische CNG-Kanal Untereinheit aus der Ratte (CNG-A2-C460W-

2 Ergebnisse

E583M) verwendet (zur Verfügung gestellt durch W. Karpén, Oregon) [139]. Die damit erzielbare Sensitivität liegt mit $0.1\text{--}5\ \mu\text{M}$ cAMP am unteren Ende des physiologischen Konzentrationsbereiches; die Kanäle reagieren etwa 7-mal empfindlicher auf cAMP als auf cGMP.

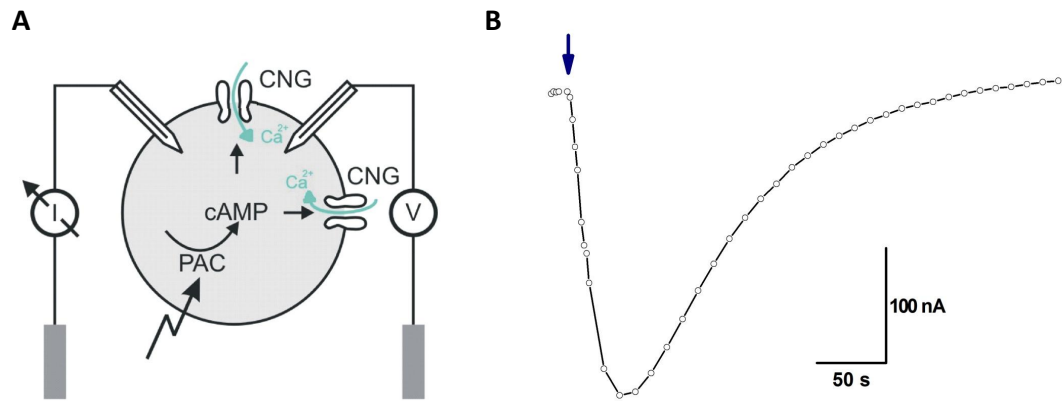


Abbildung 2.2: PAC-Funktionsassay in *Xenopus*-Oozyten nach [145]

A Koexprimiert man PAC und cAMP-aktivierbare CNG-Kanäle in Oozyten, führt Applikation von Licht zu einer Öffnung der CNG-Kanäle und ruft eine Leitfähigkeitsänderung der Membran hervor. Kurze, negative Spannungspulse bewirken Kationeneinstrome, deren zeitlicher Verlauf es erlaubt Änderungen der cAMP-Konzentration elektrophysiologisch zu verfolgen [145]. **B** Injiziert man bPAC- und CNG-Kanal-RNA in einem molekularen Verhältnis von 1:92 in Oozyten, so zieht ein 0.5 s Lichtpuls (blauer Pfeil) einen Anstieg der CNG-Ströme nach sich. Diese Ströme gehen durch die Aktivität endogener Phosphodiesterasen innerhalb von 5 min auf das Ausgangsniveau zurück. Die Spannung der Abfragepulse betrug -40 mV . Das Ergebnis wurde ursprünglich in [156] publiziert. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

Damit lichtinduzierte CNG-Ströme messbar werden, muss die cAMP-Produktion einer PAC an den Sensitivitätsbereich der Kanäle individuell angepasst werden. Um für den Nachweis der Lichtwirkung optimale Bedingungen zu finden, wurde zunächst das molekulare Injektionsverhältnis von PAC:CNG-RNA im Bereich zwischen 1:200 und 1:1 variiert. Dabei kommt beim Verhältnis 1:200 1 PAC-Molekül auf 200 Kanal-Moleküle. Die injizierte Menge an Kanal-RNA pro Eizelle betrug standardmäßig 20 ng. Mit dem Ziel, die Belastung für die Zellen durch kontinuierlich einströmende Ionen gering zu halten, wurden alle Messungen in einem diskontinuierlichem Modus ausgeführt: Mittels 100 ms kurzer Spannungs-Pulse wurde die Leitfähigkeit der Membran abgefragt. Die gemessenen Stromwerte wurden im zeitlichen Verlauf dargestellt. Alle hier beschriebenen elektrophysiologischen Messungen wurden von Frau Maila Reh ausgeführt.

bPAC ruft große, langanhaltende Photoströme in *Xenopus laevis*-Oozyten hervor

Exprimiert man bPAC und CNG-Kanäle im RNA-Verhältnis von 1:92, erhält man nach 3 bis 4 Tagen deutliche, lichtinduzierbare Stromsignale. In Abbildung 2.2 B ist eine typische, an einer Oozyte gemessene Stromkurve dargestellt. Die Stromkurve entsteht nach einem 0.5 s langen Lichtimpuls und ergibt sich aus der cAMP-vermittelten Öffnung der CNG-Kanäle. Sie durchläuft nach ca. 50 s einen Maximalwert und geht im Verlaufe von 5 Minuten auf ihr Ausgangsniveau zurück. Dabei zeigt dieses reversible Verhalten die Aktivität endogener Phosphodiesterasen an. An einer Zelle waren durchschnittlich bis zu 5 Wiederholungsmessungen mit reproduzierbar großen Strömen möglich. Die Standardabweichung der Stromamplitude lag bei $264 \text{ nA} \pm 77 \text{ nA}$ ($n=7$). Mit zunehmender Anzahl durchgeführter Messungen nahmen der Dunkelstrom und die Stromamplitude zu und zeigten das Absinken des Membranwiderstandes an. In Oozyten derselben Charge variierte die Stromamplitude um ca. 25 %.

Unter den gewählten Expressionsbedingungen erwies sich ein bPAC:CNG-Verhältnis von 1:92 als optimal: Während Oozyten, mit geringem bPAC-Anteil keine oder nur schwache lichtabhängige Stromsignale zeigten, führte eine zu starke bPAC-Expression zur Destabilisierung der Zellmembran. Letzteres Verhalten kann durch eine basale Enzymaktivität bPACs im Dunkeln verursacht werden. Kontrollmessungen wurden sowohl mit unbehandelten Oozyten als auch mit Oozyten ausgeführt, die jeweils nur die CNG-Kanäle bzw. nur die bPACs enthielten. In keinem Fall ergaben sich dabei lichtabhängige Ströme. Der Expressionsnachweis von bPAC erfolgte durch Immunoblotting gegen den C-terminalen Myc-Affinitätsmarker, so dass Messartefakte ausgeschlossen werden können.

Um die Lichtabhängigkeit der Ströme zu zeigen, wurde eine Reihe von Stromkurven bei abgeschwächter Intensität des Anregungslichtes aufgenommen (Abbildung 2.3 A). Dabei ergab sich, dass die Amplituden der Stromkurven zur produzierten cAMP-Menge und damit zur Lichtmenge proportional sind. Eine Sättigung der CNG-Ströme durch cAMP wurde bei der verwendeten Photonenflussrate ($0.85 \text{ mMol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) nicht erreicht. Wegen der begrenzten Belastbarkeit einer Oozyte konnte der kinetische Verlauf nicht detaillierter aufgeschlüsselt werden; es deutet sich aber an, dass bei geringen Lichtintensitäten die Dauer der Stromantworten nur im schwachen Maß von der applizierten Lichtmenge abhängt.

Mehrfache Anregung der Zellen mit 400 ms-Lichtpulsen bewirkte eine gleichmäßige Steigerung des Photostromes auf bis zu -900 nA (Abbildung 2.3 B). Das Abklingen des Stromes bleibt davon unbeeinflusst. Die Ergebnisse zeigen, dass die Stärke der lichtinduzierten Zellantwort über die Lichtdosis eingestellt werden kann.

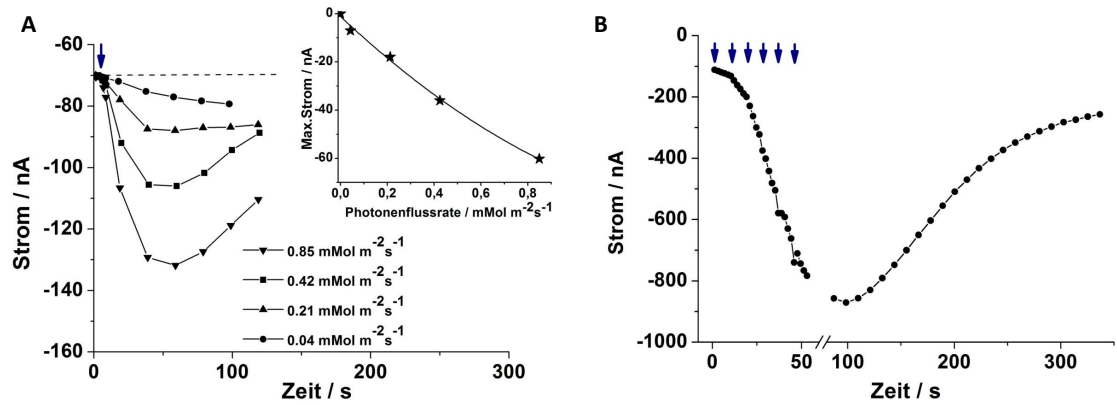


Abbildung 2.3: bPAC-vermittelte Photoströme sind durch die Lichtdosis titrierbar

A Lichtinduzierte CNG-Ströme nach Applikation eines 400 ms Lichtpulses (blauer Pfeil) unterschiedlicher Intensität (0.85 , 0.42 , 0.21 und $0.04 \text{ mMol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Die Maximalwerte der CNG-Ströme steigen mit zunehmender Lichtdosis (Ausschnitt). Die gepulsten Messungen wurden nach 4 Tagen in einzelnen bPAC- und CNG-Kanal-exprimierenden Oozyten bei einer Spannung von -40 mV durchgeführt. **B** CNG-Stromkurve nach repetitiver Anregung (blaue Pfeile). Applikation von sechs 400 ms-Lichtpulsen ($0.85 \text{ mMol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) vergrößert die Amplitude der Stromkurve. Die Messungen wurden nach 7 Tagen Expression bei einer Spannung von -40 mV durchgeführt.

nPAC76 ruft kurzlebige Photoströme, nPAC35 und nPAC75 rufen zeitverzögerte Stromantworten in *Xenopus laevis*-Oozyten hervor

Im Vergleich zu bPAC wurden für die drei untersuchten nPACs nur unter deutlich stärkeren Expressionsbedingungen reproduzierbare Photoströme erhalten. Während für bPAC bereits ein molekulares PAC:CNG-Kanal Verhältnis von 1:92 zu optimalen Stromantworten führt, steigt für nPAC75 der PAC-RNA-Anteil auf 1:15, für nPAC35 und nPAC76 auf 1:5 (Tabelle 2.4 A). Ein hoher PAC-Anteil deutet auf eine geringe PAC-Aktivität hin; nicht berücksichtigt ist bei dieser Abschätzung z.B. die Auswirkung unterschiedlicher Expressionsstärken.

In Abb. 2.4 B sind die mit den drei nPACs erhaltenen Stromantworten dargestellt. Für nPAC76 ergeben sich mit ca. -200 nA CNG-Ströme, die mit denen von bPAC vergleichbar sind. Abweichend davon wird der maximale Stromwert bereits nach einem Fünftel der für bPAC notwendigen Zeit erreicht. Der Rückgang auf das Ausgangsniveau erfolgt innerhalb von 40 s; nPAC76-vermittelte Stromantworten sind damit deutlich kurzlebiger. Die im Vergleich zu bPAC reduzierte Ladungsmenge weist auf eine geringere cAMP-Produktion von nPAC76 hin. Für nPAC35 und nPAC75 ergeben sich mit -700 nA bis zu -1600 nA deutlich größere lichtabhängige Ströme.

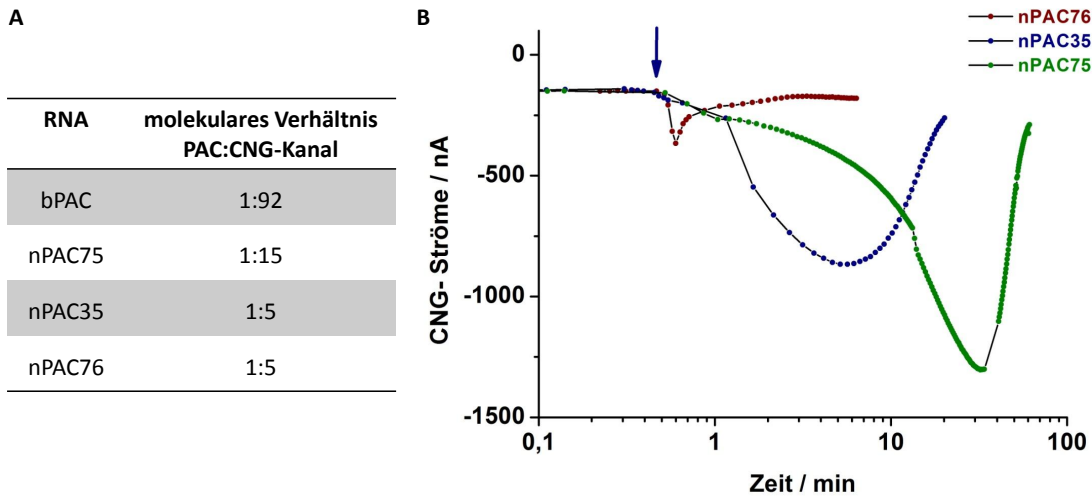


Abbildung 2.4: Injektionsverhältnisse und nPAC-vermittelte Photoströme in *Xenopus*-Oozyten

A Molekulare Injektionsverhältnisse für PAC- und Kanal-RNA. Aufgelistet sind die optimierten RNA-Injektionsverhältnisse PAC:CNG-Kanal (Anzahl an PAC-Molekülen zu Anzahl an CNG-Kanal-Molekülen), die zu größtmöglichen lichtinduzierten Strömen geführt haben. **B** Lichtinduzierte CNG-Ströme hervorgerufen durch nPAC76 (rote Kurve), nPAC35 (blaue Kurve) und nPAC75 (grüne Kurve). Die Messungen wurden nach 5 Tagen Expression, 2 s Licht mit einem 50 % Graufilter (nPAC76), nach 4 Tagen Expression, 300 ms Licht mit einem 60 % Graufilter (nPAC35) und nach 2 Expressionstagen, 50 s Licht mit einem 50 % Graufilter (nPAC75) unter den in **A** angegebenen RNA-Injektionsverhältnissen bei einer Abfragespannung von -40 mV erhalten. Der blaue Pfeil zeigt den Zeitpunkt der Lichtpulse an.

Kontrollen, die ausschließlich CNG-Kanäle exprimieren, zeigen im Messzeitraum keine vergleichbaren Ströme. Die detektierten Stromantworten sind daher auf die Wirkung der PACs zurückzuführen. Ihre Amplituden können jedoch nur teilweise durch den höheren PAC-Anteil begründet werden. Gleichzeitig sprechen die Ströme erst nach ca. einer Minute auf den Lichtpuls an und erreichen die Strommaxima nach weiteren 6 min (nPAC35) bzw. nach 34 min (nPAC75). Dieses unerwartete Verhalten kann anhand der vorliegenden experimentellen Daten nicht erklärt werden. Es ist aber wahrscheinlich, dass der durch die lange Messdauer deutlich gesteigerte Calcium-Einstrom Sekundäreffekte provoziert. Während eine Calcium-Calmodulin induzierte Inaktivierung der CNG-Kanäle eine Reduktion der Stromamplitude zur Folge haben müsste, ist eine zeitlich verzögerte Überlagerung durch Calcium aktivierte Chlorid-Ströme als Ursache denkbar. Da die *voltage-clamp* Methode nur Nettoströme erfasst, kann eine Beteiligung anderer Ionenkanäle nicht von den CNG-Strömen separiert werden. Der Kurvenverlauf deutet auf eine lichtinitiierte Aktivität durch nPAC75 und nPAC35 hin; diese kann aber auf Grundlage der Oozyten-Experimente nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Über den bakteriellen Assay hinaus ist im elektrophysiologischen Oozyten-Assay der Nachweis gelungen, dass bPAC und nPAC76 photoaktivierte Adenylatzyklasten sind. Aus dem Zeitverlauf der lichtinduzierten CNG-Ströme, sowie aus den ermittelten Injektionsverhältnissen lässt sich vermuten, dass bPAC die größte Aktivität besitzt.

2.1.3 Kleine PACs aktivieren cAMP-vermittelte Lumineszenz in *Chinese-Hamster-Ovary*-Zellen

Da Optogenetik speziell im humanmedizinischen Bereich großes Anwendungspotenzial besitzt, wurden auch Säugerzellen in die Verwendung miteinbezogen. Säugerzellen verfügen über das größte Maß an biochemischer Komplexität, gleichzeitig ist ihre Kultivierung anspruchsvoll und kostenintensiv. Um einen Funktionstest zu erhalten, der möglichst selektiv cAMP-induzierte Effekte wiedergibt, wurde ein CNG-basierter Assay in einer adhärent kultivierten *Chinese-Hamster-Ovary* Reporterzelllinie von Dr. Frank Wunder (Fa. Bayer) durchgeführt [186]. Diese exprimiert neben CNG-Kanälen auch den Calcium-Lumineszenz-Reporter Aequorin stabil. CNG-Kanäle kommen nativ als funktionelle Heterotetramere vor. Durch die Kombination von drei unterschiedlichen CNG-Einheiten (CNG-A4, CNG-A2-T537A und CNG-B1b) aus dem olfaktorischen Organ von *Bos bovis* erzielt dieser Assay eine cAMP-Empfindlichkeit, die durch eine pEC50 (negativer Logarithmus der molaren Konzentration von Forskolin, die die halbmaximale Aequorin-Lumineszenz stimuliert) von 6.6 charakterisiert ist und als hoch eingestuft wurde.

Das Prinzip des Assays beruht auf dem Nachweis eines cAMP-induzierten und CNG-vermittelten Anstiegs der intrazellulären Calcium-Konzentration durch Aequorin (siehe Abbildung 2.5). Photoaktivierung von PAC startet diese Signalkaskade und führt unter Zugabe von Calcium und in Anwesenheit des Aequorin-Substrates Coelenterazin zu blauer Lumineszenz.

Um die Expression von PAC quantitativ abschätzen zu können, wurden die PAC-Gene C-terminal mit einem rot-fluoreszierenden Protein (mCherry) markiert. Dies ermöglicht die durch PAC ausgelöste Lumineszenz auf die Expressionsstärke zu normieren. Zunächst wurden kultivierte *CHO*-Zellen mit den PAC-Genen transient transfiziert und ihre Transfektionseffizienz anhand der Fluoreszenz optimiert. Der Anteil transfizierter Zellen lag bei allen vier Konstrukten im Schnitt bei ca. 35 %. Vor jeder Messung wurde die Expressionsstärke über die mCherry-Fluoreszenz bestimmt. Die Lumineszenz wurde in Platten mit 96 Vertiefungen an einem Mikroplatten-Lesegerät gemessen. Da eine Wellenlängen-spezifische PAC-Anregung bei hoher Lichtintensität in dem Gerät nicht

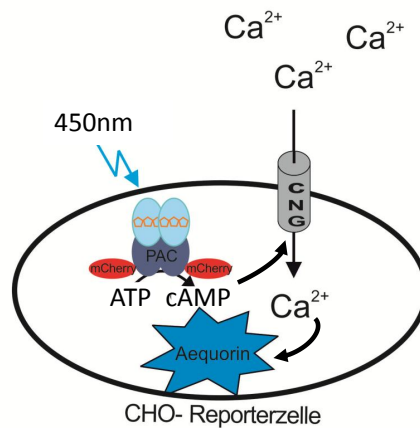


Abbildung 2.5: PAC-Funktionsassay in *CHO*-Reporterzellen [186]

In der Reporterzelllinie, die CNG-Kanäle und Aequorin stabil exprimiert, vermitteln CNG-Kanäle cAMP-abhängig einen Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration. Dieser Anstieg ruft blaue Lumineszenz des Calcium-Bindeproteins Aequorin unter Verbrauch seines Substrates Coelenterazin hervor.

möglich war, erfolgte die Belichtung extern durch eine blaue LED. Zwischen Anregung und Auslesebeginn ergab sich daraus ein 10s Zeitversatz, der auf das Einfahren der Platte zurückgeht und den initialen Lumineszenz-Anstieg überdeckt. Aus diesem Grund wurden die Messungen im „Inkubationsmodus“ durchgeführt: *CHO*-Zellen wurden extern vorbelichtet; die Calcium-abhängige Lumineszenz-Reaktion wurde im Anschluss durch Geräte-interne Injektion von Calcium gestartet. Da es sich bei dem beschriebenen Verfahren um Messungen an Zellpopulationen handelt, ist die Aussage des Assays statistisch.

bPAC ruft lang anhaltende, cAMP-vermittelte Lumineszenzeffekte in *CHO*-Zellen hervor

Am ersten Tag nach Transfektion löst 10s-Belichtung einen Anstieg der Lumineszenz in bPAC-exprimierenden *CHO*-Reporterzellen aus (Abbildung 2.6). Die Lumineszenz erreicht im Verlauf von 2s ihr Maximum und klingt innerhalb von 1min wieder ab. Zur Kontrolle wurde Calcium zu unbelichteten transfizierten Zellen hinzugegeben. Dies erzeugt spontane Lumineszenz, die aber nur einen Anteil von 10% am lichtabhängigen Gesamtsignal hat und als Hintergrundsignal betrachtet wird.

Die Befunde bestätigen die Funktion von bPAC als photoaktivierte Adenylatzyklase. Die lichtinduzierte cAMP-Produktion ist ausreichend, um die biochemische Signalkaskade zu initiieren. Die kurzlebige Natur des Lumineszenz-Signals kann den Einfluss verschiede-

2 Ergebnisse

ner Faktoren reflektieren. Als Ursachen sind der cAMP-Abbau durch endogene Phosphodiesterasen, eine Calmodulin-abhängige Inhibierung der CNG-Kanäle oder auch der Verbrauch von Aequorin denkbar. Aufgrund der irreversiblen Substrat-Umsetzung und seiner langen Regenerationsdauer kann jedes Aequorin-Molekül nur einmalig ein Photon emittieren.

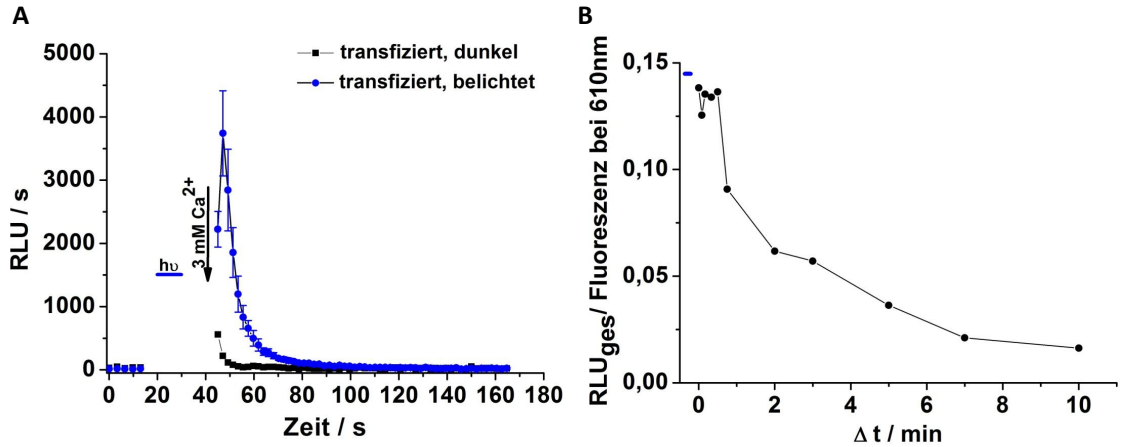


Abbildung 2.6: Optische Kontrolle des cAMP-Spiegels in *CHO*-Zellen durch bPAC

A Calcium-Zugabe zu vorbelichteten, bPAC-exprimierenden *CHO*-Zellen (blaue Kurve) im Gegensatz zu dunkeladaptierten Zellen (schwarze Kurve) ruft einen 1-minütigen Anstieg der Lumineszenz hervor. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung ($n=8$). **B** Verhalten der Gesamtlumineszenz bei zeitlich verzögerter Calcium-Zugabe. Die Gesamtlumineszenz nimmt nach bPAC-Anregung mit zunehmend verzögerter Calcium-Zugabe ab. Das Abklingverhalten spiegelt den Abbau des cAMPs durch endogene Phosphodiesterasen wider (RLU, relative light units). Die Lumineszenz wurde auf die mCherry-Fluoreszenz bei 610 nm bezogen. Die blauen Balken zeigen die Belichtung an.

Um eine Abschätzung für den durch bPAC erzeugten cAMP-Verlauf in *CHO*-Zellen zu erhalten, wurde als Maß für die cAMP-Menge die Gesamtlumineszenz durch Calcium-Zugabe zu verschiedenen Zeiten nach Belichtung bestimmt. Das durch 10 s-Belichtung entstehende cAMP wird in *CHO*-Zellen über einen Zeitraum von 10 min abgebaut (Abbildung 2.6 B). Das Lumineszenzsignal erinnert im Verlauf an bPAC-vermittelte Photoströme in Oozyten; der cAMP-Abbau durch die zellspezifischen Phosphodiesterasen erfolgt langsam und kann damit als Ursache für die kurzlebige Natur des Lumineszenz-Signals ausgeschlossen werden.

nPACs rufen cAMP-vermittelte Lumineszenz in *CHO*-Zellen nur nach minutenlanger Vorbelichtung hervor

Unter bPAC-äquivalenten Expressions- und Messbedingungen wurden für nPAC76, nPAC35 und nPAC75 keine lichtinduzierten Effekte gemessen. Lumineszenz-Werte oberhalb der Dunkelkontrolle konnten in nPAC-exprimierenden *CHO*-Zellen erst nach beträchtlicher Verlängerung der Anregungszeit erhalten werden. Für nPAC76 war eine Anregungszeit von 2 min, für nPAC35 und nPAC75 waren jeweils 20 min erforderlich. Um den Einfluss variabler Expressionstärken auszugleichen, wurde in Abbildung 2.7 B die Lumineszenz auf die mCherry-Fluoreszenz normiert. In nicht-transfizierten Zellen bewirkte die extensive Belichtung keine Lumineszenz-Effekte. Die Hintergrund-Lumineszenz ist vergleichbar der Lumineszenz in den Dunkelkontrollen (Abbildung 2.7 A). Dies belegt, dass auch die drei nPACs lichtabhängig die CNG-vermittelte Signalkaskade aktivieren können und dass es sich um funktionelle PACs handelt. Die vergleichsweise geringe Signalamplitude weist auf geringe cAMP-Produktion in Folge schwacher Adenylatzyklase-Aktivität von nPAC76, nPAC35 und nPAC75 hin.

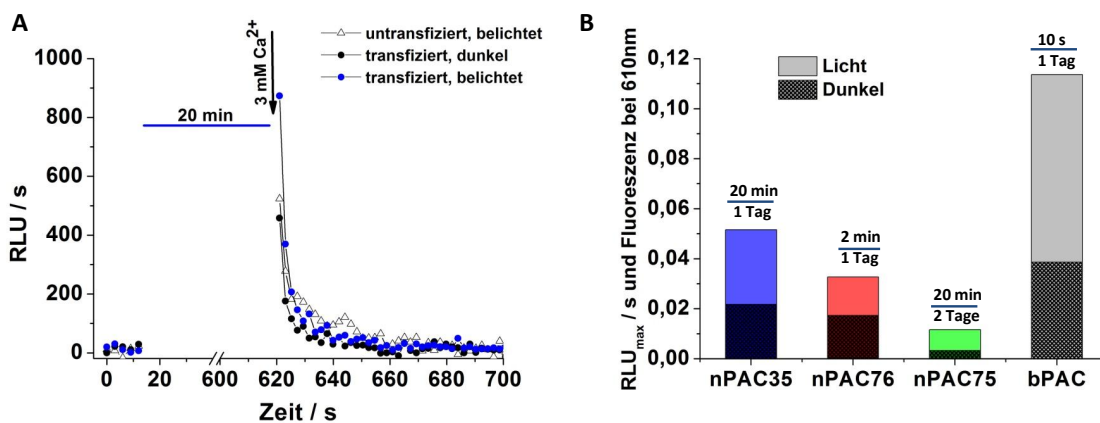


Abbildung 2.7: PAC-vermittelte Lumineszenz in *CHO*-Zellen

A In nPAC35-exprimierenden *CHO*-Zellen führt eine Vorbelichtung von 20 min und Calcium-Zugabe zu einem geringen Lumineszenzanstieg (blaue Kreise) gegenüber der Dunkelkontrolle (schwarze Kreise) und der Kontrolle in nicht-transfizierten Zellen (helle Dreiecke). Der blaue Balken zeigt die Belichtung an. **B** bPAC und nPACs rufen unter den Bedingungen 20 min Licht, 2 Tage Expression (nPAC75, grün), 20 min Licht, 1 Tag Expression (nPAC35, blau), 2 min Licht, 1 Tag Expression (nPAC76, rot) und 10 s Licht, 1 Tag Expression (bPAC, grau) in *CHO*-Reporterzellen Lumineszenzeffekte hervor. Die Lumineszenzeinheiten (RLU, relative light units) sind auf die mCherry-Fluoreszenz bei $\lambda=610$ nm normiert.

Die Analyse der vier PACs im *CHO*-Test bestätigt, dass alle kleinen PACs funktionell regulierte Adenylatzyklasten sind. Darüber hinaus zeigen bPAC und nPAC76 die deut-

lichste Lichtabhängigkeit. Aufgrund der Stärke der lichtinduzierten Zellantworten im bakteriellen Genreporter-*Assay*, im elektrophysiologischen Oozyten-*Assay* und im Funktionstest in *CHO*-Zellen ist festzuhalten, dass bPAC die stärksten Lichteffekte hervorruft und daher die größte Aktivität besitzt. Aufgrund unterschiedlicher Zeitverläufe der Lichteffekte lässt sich vermuten, dass die vier PACs zudem unterschiedliche enzymatische Eigenschaften hinsichtlich Kinetik und Licht-Dunkel-Verhältnis besitzen. Für die optogenetische Anwendung hat bPAC soweit das größte Potenzial.

Da Funktionstests in lebenden Zellen immer eine durch die zelluläre Umgebung modifizierte und meist abgeschwächte Aktivität des Enzyms wiedergeben, wird im nächsten Schritt eine biochemische und biophysikalische Charakterisierung der Enzyme unter definierten Bedingungen *in vitro* angestrebt. Dazu wurde an der Gewinnung von rekombinantem Protein gearbeitet; die Ergebnisse sind im Folgenden beschrieben.

2.2 Charakterisierung kleiner PACs *in vitro*

Biochemische und biophysikalische Untersuchungen, die an isolierten Photorezeptoren *in vitro* ausgeführt werden, haben ein allgemeines Verständnis von Struktur-Funktions-Beziehungen zum Ziel und erlauben eine vom zellulären Kontext unabhängige Bewertung der Eigenschaften potenzieller optogenetischer Werkzeuge. Abhängig von der Zielstellung und der Methode sind dafür ein bis mehrere Milligramm reines Protein erforderlich. Die Gewinnung lightsensitiver Proteine durch Isolation aus ihren Ursprungsorganismen ist aufgrund des physiologisch erforderlichen, geringen Expressionsniveaus von Photorezeptoren oft wenig effektiv. Zudem setzt es die Kultivierung des Organismus und verschiedene Separationsschritte voraus. Um daher Photorezeptoren in ausreichender Menge zu gewinnen, greift man auf heterologe Überproduktion und Isolierung aus kultivierbaren Expressionssystemen zurück. Kriterien für die Auswahl des Produktionswirtes sind Ähnlichkeit zum Ursprungsorganismus, aber auch andere Gesichtspunkte wie genetische Zugänglichkeit des Wirtes, Kosten und Aufwand seiner Kultivierbarkeit.

2.2.1 Gewinnung rekombinanter PACs aus *Escherichia coli*

Da die funktionelle Expression kleiner PACs in *E. coli* bereits auf MacConkey-Agar gezeigt ist, wird die Überproduktion und Aufreinigung aus dem gängigen, bakteriellen Expressionssystem versucht. *E. coli* ist attraktiv aufgrund seines schnellen Wachstums zu hohen Zelldichten, der großen Anzahl an regulierbaren Expressionsvektoren und bedarfsgerecht modifizierten Wirtsstämmen. Sein Unvermögen zur Ausführung posttranslationaler Modifikationen wie z.B. Glykosylierung scheint die Aktivität kleiner PACs

nicht zu beeinträchtigen. Die Neigung von *E. coli* zur Bildung unlöslichen, fehlgefalteten Proteins in Form von Einschlusskörpern (*inclusion bodies*) erweist sich häufig als problematisch.

Heterologe Expression und Aufreinigung am Beispiel von bPAC

Das erarbeitete Verfahren zur heterologen Expression und Aufreinigung kleiner PACs wird im Folgenden exemplarisch am Beispiel von bPAC dargestellt: Zunächst wurde die Überproduktion des bPAC-Gens in einem pET28(a)-Expressionsplasmid in Verbindung mit dem *E. coli*-Laborstamm BL21(DE3) versucht [107]. Das Konstrukt enthielt einen N-terminalen 6-fach Polyhistidin-Affinitätsmarker und die *E. coli* adaptierte Sequenz, die zwischen die *NdeI* und *HindIII* Restriktionsschnittstelle kloniert war, und untersteht der Kontrolle des *lac*-induzierbaren T7-Promoters [126]. Diese Kombination erlaubt nach Zugabe des Induktors IPTG die selektive Transkription von bPAC durch die ebenfalls IPTG-induzierte, chromosomal codierte T7-RNA-Polymerase. Aufgrund der großen Effektivität der T7-RNA-Polymerase ermöglicht das T7*lac*-Expressionssystem hohe Expressionslevels, besitzt aber häufig in Verbindung mit komplexen Nährmedien, die Lactose enthalten, den Nachteil einer Basalexpression.

Abbildung 2.8 A zeigt den Verlauf der Aufreinigung auf einem denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gel. Die im Zellhomogenisat bei 40 kDa nur schwach erkennbare Überexpressionsbande von bPAC ist nach Zentrifugation komplett ins Pellet übergegangen. Auf diese Weise konnte aus dem Überstand kein lösliches bPAC präpariert werden.

Verbesserung der Ausbeute an löslichem bPAC

Eine Möglichkeit um Faltung und Löslichkeit rekombinanter Proteine zu verbessern, ist Expression in Verbindung mit einem N-terminalen Fusionsprotein. Löslichkeits-vermittelnde Fusionsproteine fördern die natürliche Proteinfaltung, indem sie das Protein in Lösung halten und faktisch als Faltungskeim dienen. Aufgrund seiner geringen Größe wurde das 11.6 kDa große *small ubiquitine-related-modifier* (SUMO)-Protein verwendet. SUMO ist ein in Eukaryoten weit verbreitetes Protein zur Modulation von Proteinstruktur und Funktion [65] und hat die Fähigkeit, die Expression rekombinanter Proteine zu erhöhen und deren Löslichkeit zu verbessern [94]. SUMO kann durch die SUMO-Protease abgespalten werden; die Trennung beruht auf der Erkennung von Tertiärstruktur und ist daher hochspezifisch.

Für die Expression als SUMO-Fusionskonstrukt wurde das *E. coli* adaptierte bPAC-Gen über *BamHI* und *Hind III* in den pET-SUMO-Vektor kloniert und unter den gleichen Be-

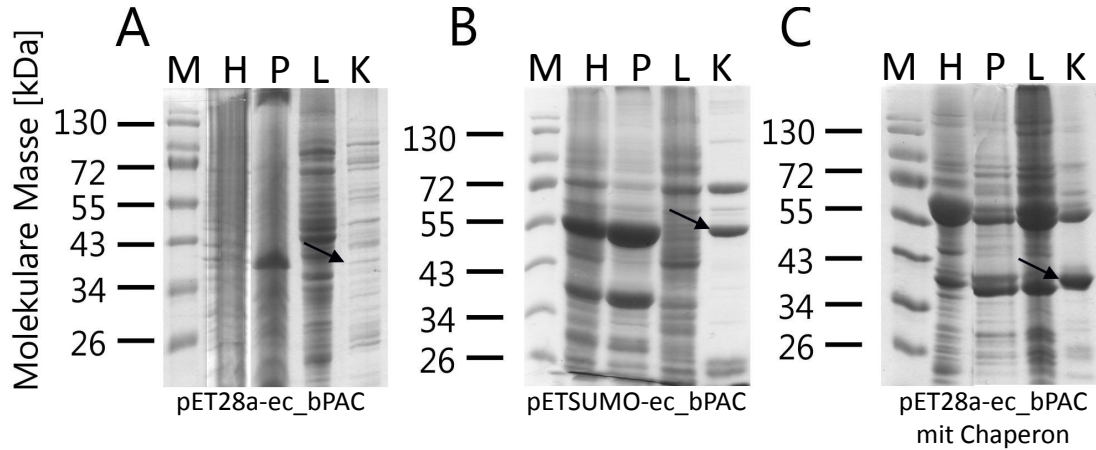


Abbildung 2.8: Präparation von bPAC aus *E. coli* unter Verwendung verschiedener Expressionskonstrukte

Die SDS-Gele dokumentieren die Präparationsverläufe von bPAC in Form der Expressionskonstrukte pET28(a) (A), pET-SUMO (B) und pET28(a) plus Chaperon (C) aus *E. coli* BL21(DE3). Aufgetragen wurden jeweils Marker (M), homogenisierte Zellfraktion (H), Zellpellet nach Ultrazentrifugation (P), lösliche Fraktion nach Ultrazentrifugation (L) sowie dialysiertes und aufkonzentriertes Eluat (K). Die Pfeile weisen auf die Banden an löslichem bPAC bei der zu erwartenden Größe des Konstruktes (A und C: 40.0 kDa, B: 53.6 kDa) hin.

dingungen wie zuvor exprimiert und gereinigt. Der Präparationsverlauf (Abbildung 2.8 B) zeigt eine starke Überexpression bei der zu erwartenden Größe des Konstruktes von 53.6 kDa. Der Großteil davon erscheint jedoch erneut als unlösliches Protein in der Pelletfraktion und ist im löslichen Überstand nicht als Einzelbande wahrnehmbar. Dennoch erhöht die Anwesenheit des SUMO-Motives die Löslichkeit des Konstruktes, sodass ein kleiner Anteil lösliches SUMO-bPAC aufgereinigt werden kann. Das konzentrierte Eluat zeigt neben der Bande von SUMO-bPAC noch zwei weitere in der Präparation enthaltene Proteinbanden bei 72 und 20 kDa. Diese Banden zeigen vermutlich Verunreinigungen mit unspezifischer Affinität zum Säulenmaterial z.B. Hitzeschockproteine an. Die 72 kDa-Bande kann allerdings auch auf assoziiertes bPAC oder auf stabile Dimerie zurückgehen. Im Fall der kleineren Bande ist auch das Vorhandensein von bPAC-Bruchstücken möglich. Falls es sich dabei nicht zufällig um Proteine mit intrinsischer Adenylatzyklase-Aktivität handelt, ist die Anwesenheit dieser Verunreinigungen für die weiteren geplanten spektroskopischen und biochemischen Untersuchungen weitestgehend unerheblich. Eine Erhöhung des Kultiviertumens auf 6 l ermöglichte die Reinigung rekombinanten bPACs mit einer Ausbeute von etwa 0.17 mg pro 10 g Zellmaterial. Diese Menge ist gering, für grundlegende biochemische und spektroskopische Untersuchungen doch zunächst ausreichend.

Zu einem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Arbeit wurde im Rahmen der Kooperation mit der AG Schlichting (MPI Heidelberg) ein BL21(DE3)-Expressionsstamm erhalten, der zusätzlich ein Chaperon-codierendes Plasmid enthält (eigene Konstruktion, E. Hartmann). Chaperone sind als Helferproteine in den Faltungsprozess involviert; ihre Koexpression trägt häufig zur verbesserten Löslichkeit rekombinanter Proteine bei [59]. Erneut enthält das konzentrierte Eluat eine zusätzliche Bande bei 53 kDa. In diesem Fall handelt es sich um eine Verunreinigung durch Chaperone (pers. Kommunikation, E. Hartmann). Unter Verwendung des Chaperon-Stammes erzielt die Überproduktion des Konstruktes pET28-bPAC einen Ertrag von 1.7 mg pro 10 g Zellen. Das entspricht der 10-fachen Menge bPAC gegenüber dem SUMO-Konstrukt (siehe Tabelle 2.9).

Gewinnung von rekombinanten nPACs

Aufgrund des positiven Einflusses von SUMO auf die Löslichkeit von bPAC wurden auch die nPAC-Gene unter Verwendung der *Bam*HI und *Hind*III-Schnittstellen in pET-SUMO kloniert und unter den für bPAC gefundenen Bedingungen zur Expression gebracht. Die Präparation ergab für alle drei nPACs lösliches Protein (nicht gezeigt). Die Ausbeuten von nPAC35 und nPAC75 waren mit < 1 mg pro 10 g gering und vergleichbar zu bPAC (siehe Tabelle 2.9); nPAC76 konnte in deutlich größerer Menge von 20 mg pro 10 g Zellen aufgereinigt werden.

Um den Einfluss des SUMOs auf die Löslichkeit der Proteine abschätzen zu können, wurde die Expression des gut löslichen nPAC76 ohne N-terminale Fusion getestet.

Protein	Expressionsvektor	Ausbeute [mg/10g Zellen]
bPAC	pET-SUMO	0.17
	pET28a plus Chaperon	1.7
nPAC75	pET-SUMO	0.65
nPAC35	pET-SUMO	0.93
nPAC76	pET-SUMO	20
	pET28a	2.4
	pASK43p	10

Abbildung 2.9: Proteinausbeuten aus verschiedenen Expressionskonstrukten

Die Tabelle gibt die PAC-Ausbeuten an, die unter Verwendung des jeweiligen Expressionsvektors bei vergleichbaren Expressions- und Präparationsbedingungen aus *E. coli* BL21(DE3) erhalten wurden.

Zu diesem Zweck wurde nPAC76 nach dem N-terminalen 6-fach Polyhistidin-Affinitätsmarker über *Bam*HI und *Xho*I zum einen in pET28, zum anderen in pASK43p einge-

führt. Im Gegensatz zum *T7lac*-Expressionssystem erfolgt die Regulation der Expression in pASK mit einem Tetrazyklin (tet)-induzierbaren Promoter, der unabhängig von genetischen Hintergrund des Expressionsstammes durch die *E. coli* eigene Polymerase abgelesen wird [153]. Der Vorteil des Systems für die Expression schwer löslicher Proteine ist eine im Vergleich zur T7-RNA-Polymerase geringere Prozessivität und eine geringe Basalexpression.

Beide Konstrukte wurden unter vergleichbaren Bedingungen überproduziert und aufgereinigt. Die Ausbeute an nPAC76 aus pET beträgt 2.4 mg pro 10 g Zellmaterial, die Ausbeute aus pASK43 beträgt durchschnittlich 10 mg nPAC76 pro 10 g Zellmaterial (Tabelle 2.9). Unter Verwendung des pASK-Systems wird demnach die 4-fache Menge an löslichem Protein erhalten. Diese Menge ist ausreichend, um eine genauere spektroskopische Analyse ihrer Photochemie und Thermostabilität vorzunehmen. Die entsprechenden Arbeiten wurden von Herrn Prof. Alfons Penzkofer (Universität Regensburg) durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.3).

bPAC bildet in Lösung Dimere

Um den oligomeren Zustand und die Reinheit der präparierten Proteine beurteilen zu können, wurde die Größe von BLUF (bPAC), bPAC und der SUMO-bPAC Variante Y7F mittels Größenausschlusschromatographie bestimmt. bPAC-BLUF (Reste 1 bis 125), bPAC sowie SUMO-bPAC-Y7F eluieren mit ihrem Hauptpeak bei 52.6, 57.7 und 59.8 min (Abb. 2.10 A).

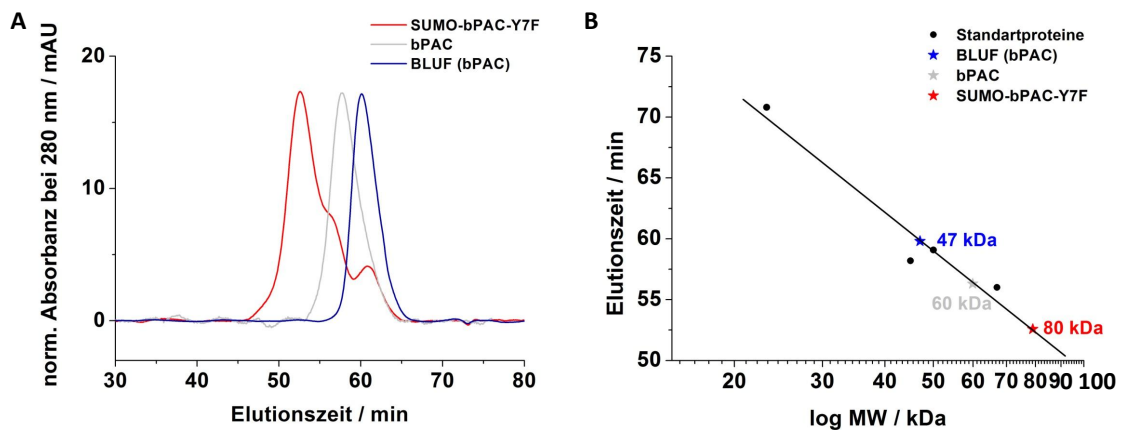


Abbildung 2.10: Bestimmung der molekularen Größe von bPAC und Varianten mittels Größenausschlusschromatographie

A Elutionsprofile von bPAC (rot), bPAC-BLUF (blau) und SUMO-bPAC-Y7F (grün). **B** Die Ferguson-Darstellung mit Standardproteinen und bPAC-Proben. Die Analyse ergibt für bPAC, bPAC-BLUF und SUMO-bPAC-Y7F eine scheinbare, molekulare Masse von 47, 60 und 80 kDa.

Das Chromatogramm von SUMO-bPAC-Y7F zeigt zusätzlich eine Schulter bei 56.4 min und eine weitere Bande bei 60.9 min. Diese weisen auf ein heterogen vorliegendes Protein oder auf Verunreinigungen bzw. Bruchstücke in der Präparation hin. Aus der Ferguson-Darstellung mit den Standardproteinen Rinderserumalbumin, Ovalbumin, α -Amylase und Lysozym (Abb. 2.10 B) wird die scheinbare, molekulare Masse von BLUF (Monomer: 17 kDa) auf 47 kDa, von bPAC (Monomer: 40.0 kDa) auf 59.9 kDa und von SUMO-bPAC-Y7F (Monomer: 53.6 kDa) auf 79 kDa bestimmt. Es ist daher wahrscheinlich, dass bPAC und SUMO-bPAC als Dimer in Lösung vorliegen. Die BLUF-Domäne alleine scheint dagegen Trimere auszubilden. Da das Elutionsverhalten der Proteine wesentlich durch ihren hydrodynamischen Radius bestimmt wird, sind Abweichungen vom tatsächlichen Molekulargewicht denkbar.

2.2.2 Spektroskopische Eigenschaften kleiner PACs

Optische Spektroskopie ist eine häufig angewendete Methode, um Informationen über molekulare Eigenschaften von Proteinen zu erhalten. In Photorezeptoren triggert Licht meist eine Abfolge photochemischer Reaktionen des Kofaktors, die oft von Änderungen im sichtbaren Spektralbereich von 360-600 nm begleitet sind. Diese Veränderungen des Kofaktors können mittels Absorptionsspektroskopie im UV/vis-Bereich spektral und zeitlich aufgelöst werden. Zur Aufnahme der Spektren langlebiger Spezies und deren Änderungen im Sekunden und Minuten Bereich genügen meist Ein- oder Zweistrahl-spektrometer; kurzlebige Photozyklus-Intermediate erfordern den Einsatz von Blitzlicht-Photolyse- oder Pump-Probe-Systemen.

Kleine PACs besitzen BLUF-typische Absorptionsspektren

Dunkel- und lichtadaptierte Spektren im UV/vis-Bereich wurden zunächst mit einem Zweistrahl-Spektrometer aufgenommen. Die Messungen wurden für PACs, deren Dunkelrückkehr im Sekundenbereich verläuft, an einem Blitzlicht-Photolyse-Setup mit integrierter Kamera wiederholt.

Das Spektrum von dunkeladaptiertem bPAC, das in Abb. 2.11 A stellvertretend gezeigt ist, weist im Bereich von 550 bis 250 nm drei Absorptionsbanden auf. Die Banden im sichtbaren Bereich (300-500 nm) gehen exklusiv auf die Absorption des Kofaktors zurück und entsprechen den elektronischen S_1 - und S_2 -Übergängen von oxidiertem Flavin bei 441 und 376 nm. Die dominante Bande mit einem Maximum bei 272 nm resultiert aus einer Überlagerung von $n-\pi^*$ -Übergängen des Flavins und der Absorption der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan.

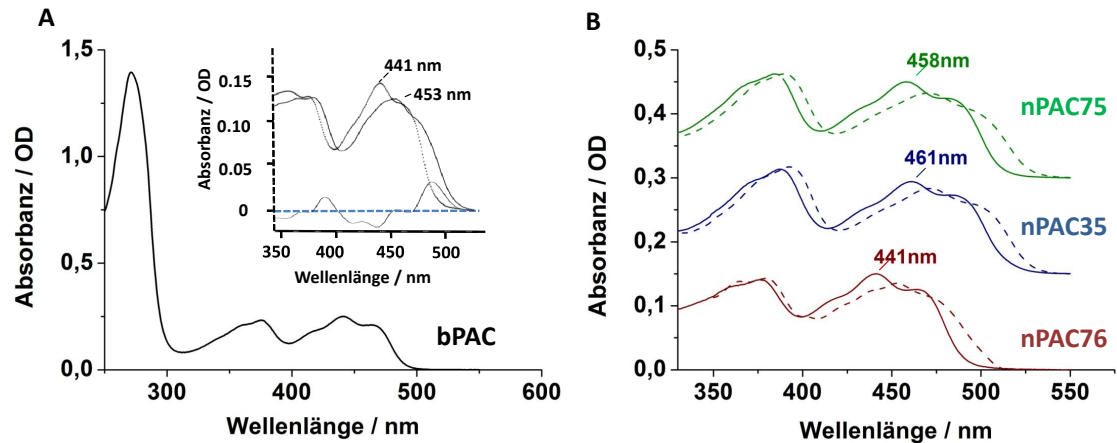


Abbildung 2.11: Absorptionsspektren kleiner PACs im Dunkeln und nach Beleuchtung

UV/vis-Absorptionsspektren von bPAC (A) und nPACs (B). **A** Spektrum von dunkeladaptiertem bPAC im Bereich von 250-600 nm und Ausschnitt dunkel- und lichtadaptierter bPAC-Spektren (gestrichelte bzw. durchgängige Linie) mit S_1 -Absorptionsmaxima, sowie Licht-minus-Dunkel-Differenzspektrum (grau) im Bereich von 350-520 nm. Die Ergebnisse wurden ursprünglich in [156] publiziert. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology. **B** Dunkel- und lichtadaptierte Spektren (durchgängige bzw. gestrichelte Linie) von nPAC76 (rot), nPAC35 (blau) und nPAC75 (grün) mit S_1 -Absorptionsmaxima. Spektren dunkeladaptierter Proben wurden im UV/vis-Spektrometer Cary 300 aufgezeichnet, die Aufnahmen lichtadaptierten Spektren erfolgten nach Anregung mit einer blauen LED durch eine ICCD Kamera. Versetzter Maßstab der Y-Achse.

Beleuchtung der Probe für 5 s mit einer blauen LED (456 nm) führt zur Ausbildung des für BLUF-Domänen typischen, um 12 nm rotverschobenen Intermediates, das im Bildausschnitt neben den Grundzustand und dem Licht-minus-Dunkel-Differenzspektrum dargestellt ist (Abbildung 2.11 A). Abweichend von der Absorption reinen Flavins in Lösung zeichnen sich die Spektren in diesem Bereich durch eine charakteristische Feinstruktur aus. Die Ausbildung der Licht-Spezies geht mit einer Verminderung an Feinstruktur einher.

Ebenso wie bPAC weisen die drei nPACs BLUF-typisches Photozyklusverhalten auf und bilden nach Beleuchtung das rotverschobene Intermediat. Licht- und dunkeladaptierte Spektren zeigen die für BLUF charakteristische Absorptionsbanden mit Feinstruktur. nPAC76 besitzt wie bPAC und viele andere BLUF-Domänen eine maximale S_1 -Absorption bei 441 nm. Im Unterschied dazu sind die Spektren von nPAC75 und nPAC35 in ihrer Lage um nahezu 17 bzw. 20 nm auf 458 und 461 nm verschoben (siehe Tabelle 2.12).

Die vier kleinen PACs unterscheiden sich in der Photodynamik des Signalzustandes

Die thermische Relaxation des rotverschobenen Intermediates wurde über das Abklingen der Licht-minus-Dunkel-Differenzabsorption bei 493 bzw. 510 nm verfolgt. Der Zerfall wird, wie in den meisten BLUF-Domänen, durch eine monoexponentielle Rückkehrkinetik gut beschrieben und ist in Abb. 2.12 A am Beispiel von bPAC gezeigt. Die für die vier PAC ermittelten Zeitkonstanten sind in Tabelle 2.12 B angegeben.

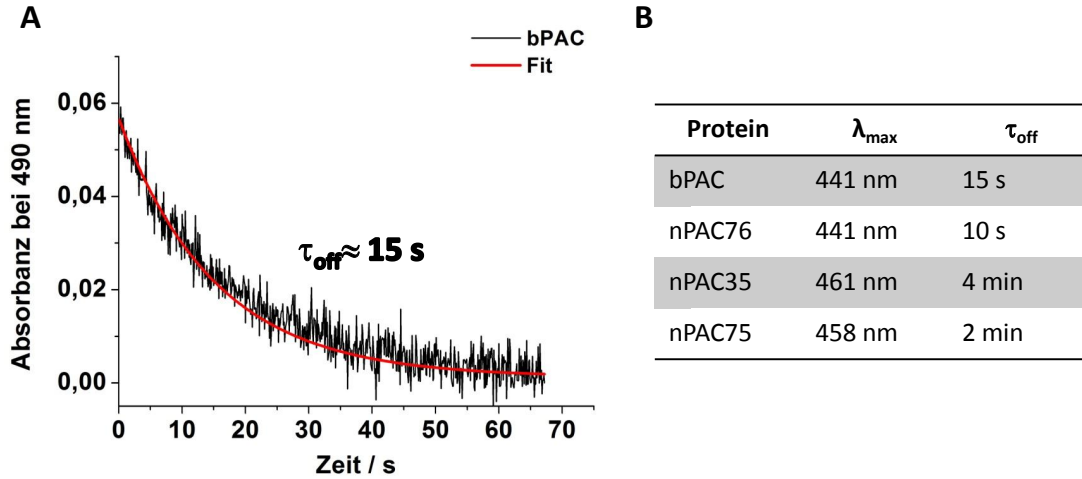


Abbildung 2.12: Kinetik des Signalzustandes kleiner PACs

A Zerfall des bPAC-Signalzustandes. Die Beschreibung des Zerfalls durch einen monoexponentiellen Fit ergibt eine Zeitkonstante von $\tau_{off} \approx 15 \text{ s}$. **B** Tabellarische Übersicht über die Lage der S_1 -Absorptionsmaxima λ_{max} und die Zeitkonstanten der Rückkehr in den Dunkelzustand τ_{off} kleiner PACs

Nach Abb. 2.12 A und B kehren lichtadaptiertes bPAC und nPAC76 mit einer Zeitkonstante von 15 bzw. 10 s in den Dunkelzustand zurück. Dagegen sind die rotverschobenen Intermediate von nPAC35 und nPAC75 mit 4 und 2 min deutlich langlebiger. Um mögliche mechanistische Aspekte zu finden, wurde speziell die Rückkehrkinetik von bPAC auf eine Abhängigkeit durch den pH-Wert untersucht. Im pH-Bereich von 6.5 bis 8.0 konnte kein Einfluss auf die Zeitkonstante festgestellt werden.

Um Informationen über die mögliche Existenz weitere Intermediate während des Abklingvorganges zu erhalten, wurden die kleinen PACs auch mittels Blitzlicht-Photolyse analysiert. Dazu wurde eine Serie von Spektren in kurzen Abständen nach Anregung aufgenommen, und als Licht-Dunkel-Differenzspektren über die Zeit dargestellt. Abbildung 2.13 zeigt exemplarisch den Spektralverlauf für bPAC und bestätigt den Zerfall der Differenzbanden mit einer Zeitkonstante von 15 s. Zusätzliche Intermediate wurden

nicht detektiert.

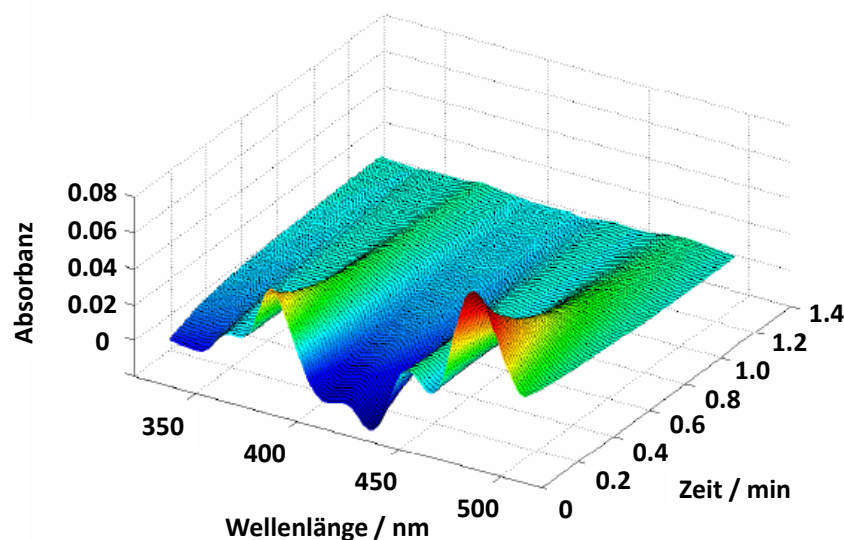


Abbildung 2.13: Sequenz von bPAC Licht-minus-Dunkel-Differenzspektren
bPAC wurde für 200 ms mit einer LED bei 455 nm angeregt. Dargestellt ist die mit einer ICCD Kamera verfolgte Rückkehr in den Dunkelzustand. Die Licht-minus-Dunkel-Differenzspektren wurden im Abstand von 100 ms aufgenommen und über jeweils 10 Spektren gemittelt.

Die UV/vis-spektroskopischen Untersuchungen auf der Langzeitskala zeigen, dass alle vier nPACs BLUF-typisches photochemisches und photodynamisches Verhalten aufweisen. Trotz teilweise hoher Sequenzidentität weist jedes PAC charakteristische Eigenschaften auf: nPAC35 und 75 zeichnen sich durch ihre rotverschobenen Absorptionsspektren, sowie ihre langsamen Rückkehrkinetiken von bPAC und nPAC76 ab.

Eine umfassendere UV/vis-spektroskopische Analyse des Photozyklusverhaltens konnte zu diesem Zeitpunkt und aus Gründen der Materialverfügbarkeit nur an nPAC76 durchgeführt werden und ist im anschließenden Kapitel 2.2.3 beschrieben.

2.2.3 Photozyklus-Studie an nPAC76 und Thermostabilität

Die Kenntnis des Photozyklus-Verhaltens und seiner kinetischen Parameter ist für potenzielle Anwender wichtig. Neben der Lebensdauer des Signalzustandes ist dabei besonders die effiziente Umsetzung des Lichtes in biologische Information bedeutend. Diese wird durch die Quantenausbeute des Signalzustandes eines Photorezeptors beschrieben und gibt den Anteil absorbierten Photonen wieder, die zur Bildung aktiver Spezies geführt haben. Obwohl die Quantenausbeute des Signalzustandes wesentlich durch die Photo-

chemie des Kofaktors und seine unmittelbare Umgebung bestimmt ist, sind vergleichende Untersuchungen an Vollängenrezeptoren notwendig. Analysen dieser Art wurden mangels Verfügbarkeit an rekombinantem Protein bislang nur an der Blaulicht-aktivierbaren Phosphodiesterase BlrP1 vorgenommen [172].

nPAC76 enthält eine Flavinmischung aus FMN und FAD

Heterolog in *E. coli* exprimierte BLUF-Proteine enthalten gewöhnlich eine Mischung aus den verfügbaren Flavinderivaten FAD, FMN und Riboflavin [77]. Aufgrund von kleineren Differenzen bezüglich des Extinktionskoeffizienten, des Anregungs- und insbesondere des Fluoreszenzverhaltens ist für eine detaillierte photochemische Analyse die Kenntnis der genauen Zusammensetzung notwendig. Auf Basis unterschiedlicher Struktur und Ladung wurde die Flavinzusammensetzung der Proteinprobe durch Trennung mittels Umkehrphasen *High-Performance-Liquid-Chromatographie* (HPLC) bestimmt. Entsprechend ihrer Polarität eluieren FAD, FMN und Riboflavin in polarer mobiler Phase von der stationären C18-Phase.

Flavin	Retentionszeit [min]	relativer Anteil
Riboflavin	5.2	0
FMN	3.7	0.7
FAD	2.5	0.3

Abbildung 2.14: Flavinzusammensetzung von nPAC76

Angegeben ist die Retentionszeit der Flavinderivaten Riboflavin, Flavinmononukleotid und Flavinadenindinukleotid und deren relativer Anteil an der Gesamtmischung in nPAC76.

Unter den angegebenen Bedingungen (siehe Abschnitt 4.3) entspricht dies Retentionszeiten von 2.5, 3.7 und 5.1 min. Aus der Höhe des zugehörigen *Peaks* wurde ein relativer Anteil von 70% FMN und 30% FAD ermittelt (Tabelle 2.14). Anders als die meisten BLUF-Domänen bindet nPAC76 kein Riboflavin und zeigt Kofaktorselektivität für geladene Flavine [102].

nPAC76 zeigt BLUF-typische Photozyklus-Eigenschaften und zeichnet sich unter anhaltender Belichtung durch eine irreversible Bildung von reduziertem Flavin aus

Die nachfolgend beschriebenen spektroskopischen Messungen sind durch Prof. Penzkofer an der Universität Regensburg durchgeführt und gemeinsam veröffentlicht worden [127,

2 Ergebnisse

128, 129]. Dafür wurde ihm präpariertes nPAC76 (Puffer: 50 mM Natriumphosphat, 300 mM Natriumchlorid, 5 mM β -Mercaptoethanol, pH 7.5) zur Verfügung gestellt. Über die grundlegende spektroskopische Charakterisierung hinaus wurde das photochemische Verhalten, die Dynamik der Photozyklus-Intermediate, das Aggregationsverhalten und die Thermostabilität von nPAC76 untersucht. Dazu wurden Absorptionsquerschnitts-Spektren, Fluoreszenz-Quantenverteilung und Fluoreszenzdynamik von licht- und dunkeladaptiertem nPAC76, sowie die Übergangsdynamik beider Zustände mit einer *Streak*-Kamera bestimmt. Zuvor wurde der Anteil an freiem Flavin in der Probe ermittelt und bei der Auswertung berücksichtigt. Darüber hinaus wurde das photochemische Verhalten von nPAC76 nach Mehrfach-Anregung und unter kontinuierlicher Beleuchtung verfolgt. Die Bedeutung der ermittelten Parameter (Tab. 2.15 B) ist in Abbildung 2.15 A in Form eines Photozyklus-Schemas veranschaulicht.

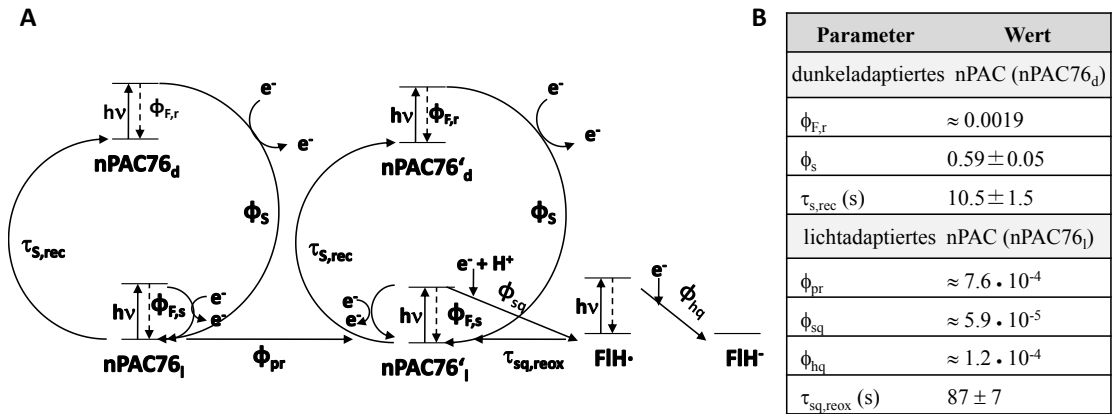


Abbildung 2.15: Photozyklus-Schema von nPAC76

A Dreigliedriges Photozyklus-Schema von nPAC76, bestehend aus dem linken, initialen BLUF-Photozyklus, dem mittleren BLUF-ähnlichen Photozyklus mit verstärkter Semichinonausbildung und dem rechten Elektronentransferprozess, der zur vollständigen Reduktion des Kofaktors führt. Aus dem Grundzustand angeregtes nPAC76_d desaktiviert durch Fluoreszenz oder bildet nach produktiven Elektronentransfer das rotverschobene Intermediat nPAC76_l mit einer Quantenausbeute von ϕ_S aus. nPAC76_l relaxiert mit einer Zeitkonstante von $\tau_{s,rec}$. Mehrfach-Anregung von nPAC76_l führt unter dauerhafter Änderung ihrer Konformation zur Bildung modifizierten nPAC-Spezies (nPAC76_{d'} und nPAC76_{l'}), die sich von der nativen Form durch die Fähigkeit zur Ausbildung des neutralen Semichinonradikals (FIH•) unterscheiden. Erneute Anregung des Neutralradikals zieht die vollständige Reduktion zu FIH⁻ nach sich. **B** Tabelle mit Photozyklus-Parametern von nPAC76, darunter die Fluoreszenzquantenausbeute $\phi_{F,r}$, die Quantenausbeute des Signalzustandes ϕ_S und die Zeitkonstante der Rückkehr in den Dunkelzustand $\tau_{s,rec}$, sowie die Quantenausbeuten der Proteinkonformationsänderung ϕ_{pr} , der Semichinonbildung ϕ_{sq} , der Hydrochinonbildung ϕ_{hq} und der Zeitkonstante der Semichinonreoxidation $\tau_{sq,reo}$. Nachgedruckt aus [127] mit Erlaubnis von Elsevier.

Aus dem Dunkelzustand angeregtes nPAC76_d erfährt schnelle, produktive Desaktivierung durch Übertragung eines Elektrons und führt mit einer Quantenausbeute von $\phi_S=0.59$ zur Bildung des Signalzustandes nPAC76_l. Alternativ erfolgt die Desaktivierung des angeregten Zustandes durch Fluoreszenz mit einer Quantenausbeute von $\phi_{F,r}=0.0019$. Aufgrund der limitierenden Wirkung des schnellen Elektronentransfer auf die langlebigere Fluoreszenz ist die Zeitkonstante des Elektronentransfers $\tau_{ET,r}=11$ ps durch die Fluoreszenzlebenszeit des Photozyklus-aktiven Flavins gegeben. Freies Flavin besitzt dagegen eine sehr viel längere Fluoreszenzlebenszeit von $\tau_{F,inact}=4.5$ ns. Der Signalzustand nPAC76_l relaxiert thermisch mit einer Zeitkonstante von $\tau_{s,rec}=10.5$ s in den Dunkelzustand nPAC76_d (Abbildung 2.15 A).

nPAC76_l in Abb. 2.15 A erfährt nach erneuter Anregung einen zu nPAC76_d vergleichbaren Elektronentransfer. Da bei maximaler Zeitauflösung (1 ps pro Pixel) kein Fluoreszenzbeitrag von Photozyklus-aktivem Flavin detektierbar war, muss der reduktive Elektronentransfer in diesem Zustand mit deutlich größerer Effektivität ablaufen ($\tau_{ET,s} < 1$ ps). Mehrfaches Durchlaufen des Photozyklus unter kontinuierlicher Belichtung führt im Gegensatz zu anderen BLUF-Proteinen zu einer dauerhaften Proteinkonformationsänderung ($\phi_{pr}=7.6 \cdot 10^{-4}$). In dieser Konformation zeichnet sich nPAC76' durch eine verstärkte Tendenz zur lichtinduzierten Ausbildung von neutralem Semichinonradikal FIH' mit $\phi_{sq} \approx 5.9 \cdot 10^{-5}$ aus und reoxidiert mit einer Zeitkonstanten von $\tau_{sq,reo}=87$ s. Die sukzessive Entstehung von vollständig reduziertem Flavin FIH⁻ ($\phi_{hq} \approx 1.2 \cdot 10^{-4}$) ist irreversibel. Möglicher Elektronendonator ist das im Puffer enthaltene Reduktionsmittel β -Mercaptoethanol.

nPAC76 besitzt eine große Thermostabilität und neigt zur Aggregation

Die thermische Stabilität und das Aggregationsverhalten von nPAC76 wurden indirekt über das Streuverhalten des Proteins in Lösung bestimmt [128, 129]. Als Folge der schrittweise erhöhten Temperaturen verstärkt sich die Neigung des Proteins zur Ausbildung von Aggregaten. Spektroskopisch wird dies in einer starken Abschwächung des Messlichtes im nicht absorbierenden Bereich des Proteins, einem Abflachen der Flavin-Absorptionsbande und in einer Zunahme an Fluoreszenz durch freiwerdendes Flavin sichtbar. Die Proteindenaturierung von nPAC76 setzt oberhalb von 55 °C ein und ist irreversibel. Die Schmelztemperatur von nPAC76, die einem Anteil von 50 % entfaltetem Protein entspricht, wurde mit $\vartheta=60$ °C bestimmt. nPAC76 ist damit thermisch sehr stabil und ein robuster Kandidat für biophysikalische Studien.

nPAC76 zeichnet sich zudem in Puffer und bei Raumtemperatur durch eine Tendenz zur Aggregation aus. Die Aggregatbildung nimmt mit der Lagerungsdauer bei Raum-

temperatur weiter zu. Gelfiltrationsexperimente bestätigen das Vorliegen in Form von Proteinaggregaten (siehe Anhang Abb. 14 B)). Daneben treten im spektroskopisch transparenten Bereich des Proteins intrinsische Proteinfluoreszenzen auf, deren Intensität mit zunehmender Aggregatgröße ansteigt. Da ein Betrag von Verunreinigungen ausgeschlossen werden kann, handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Effekte, die auf die Clusterbildung zurückzuführen sind [129].

2.2.4 IR-spektroskopische Charakterisierung von bPAC und der bPAC BLUF-Domäne

Strukturelle Übergänge der Effektdomäne sind in der bislang untersuchten, sichtbaren Wellenlängenregion nicht direkt wahrnehmbar. Mit dem Ziel die Enzymaktivität in einen Zusammenhang mit der Ausbildung struktureller Intermediate stellen zu können, wurden Schwingungs-spektroskopische Messungen (FTIR) an bPAC durchgeführt. Der Vergleich der Licht-minus-Dunkel-Differenzspektren von Vollängen bPAC und bPAC-BLUF Domäne kann das Auffinden von Schwingungssignaturen ermöglichen, welche mit der Adenylatzyklase Aktivierung einhergehen. Daneben ist ein Vergleich der Schwingungsspektren verschiedener BLUF-Domänen auch vor den Hintergrund spezifischer Strukturmerkmale der Rezeptorfamilie interessant.

Die Messungen an bPAC Wildtyp wurden zwecks eines besseren Signal-Rausch-Verhältnisses mit den SUMO-freien Konstrukten durchgeführt: Die kürzeren Konstrukte besitzen im Infrarotbereich ein höheres Kofaktor-zu-Protein Absorptionsverhältnis. Alle Proben enthielten den Kofaktor Magnesium, jedoch kein Substrat.

Abbildung 2.16 stellt die Licht-minus-Dunkel-Differenzspektren von bPAC und bPAC-BLUF zwischen 1500 und 1750 cm^{-1} dar. Im diesem Bereich tragen typischerweise Carbonylstreckschwingungen von Kofaktor, Aminosäureseitenketten und Sekundärstrukturelementen zur Absorption bei. Einheitliches Merkmal beider Spektren sind die Schwingungsbanden bei $1710\text{ cm}^{-1}(-)/1694\text{ cm}^{-1}(+)$. Aufgrund seiner Sensitivität für Wasserstoffbrücken enthält dieser Bereich insbesondere Informationen über lichtinduzierte Änderungen des Kofaktor-umgebenden Wasserstoffbrücken-Netzwerkes. In BLUF-Domänen wird die 16 cm^{-1} Verschiebung dieser Bande zu geringeren Wellenzahlen größtenteils auf die Neubildung der Wasserstoffbrücke zwischen Flavin C(4)=O und der Glutamin-Seitenkette zurückgeführt und repräsentiert daher Entstehung des rotverschobenen Intermediates in bPAC und der isolierten BLUF-Domäne [45, 98, 99].

Änderungen der Carbonylschwingung in Sekundärstrukturelementen werden üblicherweise im Wellenlängen-Bereich von 1670 cm^{-1} bis 1620 cm^{-1} gefunden. Die gemeinsame

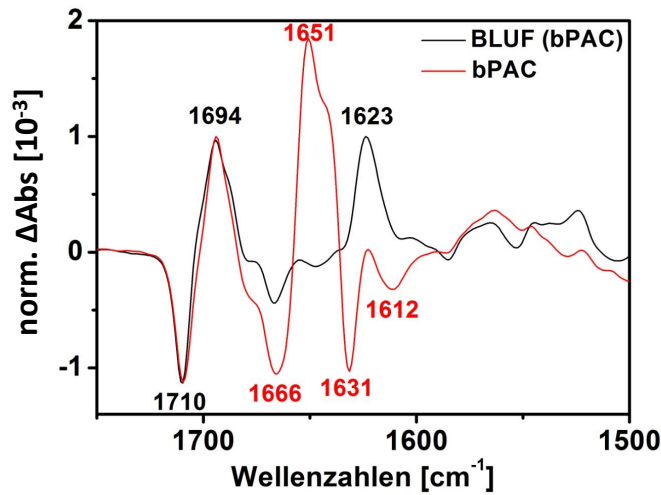


Abbildung 2.16: FTIR-Differenzspektren von bPAC und der bPAC BLUF-Domäne

Licht-minus-Dunkel-FTIR-Differenzspektren von Volllängen-bPAC (rot) und bPAC-BLUF-Domäne (schwarz). Die Differenzspektren wurden auf die Bande bei 1694 cm^{-1} normiert. Die Aufnahmen erfolgten bei einer Auflösung von 3 cm^{-1} bei Raumtemperatur. Zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses wurden jeweils 10 Spektren zu je 100 Aufnahmen gemittelt.

Bande bei 1666 cm^{-1} (-) kann demnach strukturellen Änderungen in β -Schleifen (*turns*) zugeordnet werden [150].

Deutliche Unterschiede weisen die Spektren allerdings in der angrenzenden Sekundärstrukturregion auf. Die positive Bande bei 1623 cm^{-1} , die im Spektrum der BLUF-Domäne überwiegt, scheint im bPAC-Spektrum durch die negative Bande bei 1631 cm^{-1} überlagert zu sein. Banden in diesem Bereich werden typischerweise mit Änderungen der β -Faltblattstruktur assoziiert und treten in beiden Proteinen auf. Im BLUF-Rezeptor AppA konnte die Zuordnung der wahrscheinlich entsprechenden Bande (1632 cm^{-1}) zu dem $\beta 5$ -Faltblatt vorgenommen werden; das Einführen einer Punktmutation unmittelbar vor dem $\beta 5$ -Faltblatt unterdrückte die Ausbildung des lichtinduzierten Signals [98]. Dominierendes Signal im Spektrum der Volllängen-Probe ist die positive Bande im Bereich α -helikaler Strukturänderungen (1651 cm^{-1}) mit ausgeprägter Schulter zu geringeren Frequenzen hin. Ein entsprechendes Signal fehlt im BLUF-*Linker* Konstrukt vollständig. Dieses Signal kann daher seinen Ursprung nur in der Zyklase-Domäne haben und ist ein möglicher Indikator für strukturelle Änderungen während der Photoaktivierung. Demnach wäre Photoaktivierung in bPAC mit der Zunahme α -helikaler Strukturen verbunden.

2.2.5 Enzymaktivität kleiner PACs *in vitro*

Die Bestimmung der Zyklaseaktivität von rekombinantem Protein stellt eine wichtige Grundlage dar, um die Anwendbarkeit der vier kleinen PACs einschätzen zu können. Unabhängig von zellulären Faktoren wie Zellgröße, endogene Enzymaktivität, Lokalisation oder Protein-Löslichkeit erlaubt die Analyse im azellulären Kontext und unter standardisierten Bedingungen den direkten Vergleich von PAC-Aktivitäten. Durch gezielte Variation der Test-Parameter können Enzymkenngrößen in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren untersucht werden.

Der quantitative Nachweis der Nukleotide *in vitro* kann über radiometrische oder immunologische Methoden, sowie über den Umsatz Fluoreszenz-markierter Nukleotide erfolgen. Eine andere weit verbreitete Methode zur analytischen Quantifizierung von ATP und cAMP ist die chromatographische Trennung mittels HPLC, die hier zum Einsatz gekommen ist [141]. Nach dem Prinzip der Ionenpaarchromatographie vermitteln geladene Reagenzien die Interaktion geladener Analyten mit der hydrophoben Säulenmatrix. In diesem Fall stellen Tetrabutylammonium und die negativ geladenen Nukleotide das Ionenpaar dar. Die charakteristische Verweildauer der Nukleotide wurde über den Anteil an organischem Lösungsmittel oder die Ionenstärke der mobilen Phase eingestellt und für die Analyse von ATP und cAMP optimiert.

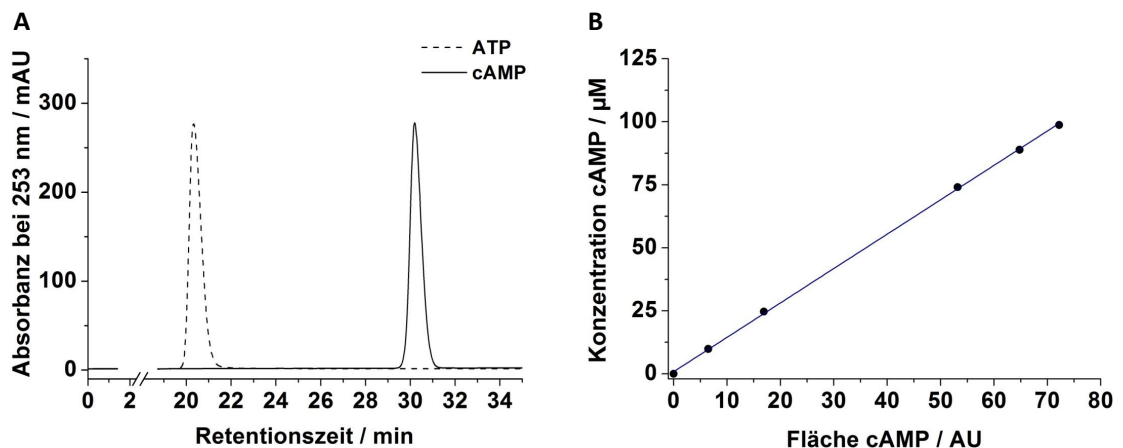


Abbildung 2.17: HPLC-basierte Nukleotidanalyse und Eichung

A HPLC-Chromatogramm eines 5 nmol ATP- und cAMP-Standards. ATP eluiert bei 20.3 min und zeitlich vor cAMP (30.1 min). **B** Die integrierte Chromatogrammfläche zeigt im Bereich bis 100 µM cAMP eine lineare Abhängigkeit von der aufgetragenen cAMP-Menge.

Chromatographische Nukleotidanalyse

Die analytische Trennung von ATP und cAMP wird isokratisch in einem Phosphatpuffer mit 10 %-igem Methanolanteil durchgeführt. Unter den gewählten Bedingungen eluieren die Nukleotid-Standards ATP und cAMP 20.3 min bzw. 30.1 min nach Injektion (siehe Abb. 2.17 A).

Die in Abbildung 2.17 B dargestellte Eichkurve ergibt im Konzentrationsbereich von 0-100 μM cAMP eine lineare Abhängigkeit der Signal-Integrationsfläche von der eingesetzten cAMP-Menge. Die angepasste Gerade wurde für die Berechnung der cAMP-Konzentrationen im Reaktionsansatz zu Grunde gelegt.

Kleine PACs zeigen lichtaktivierbare Enzymaktivität

Zur Bestimmung der Aktivität von bPAC im Dunkeln und im Licht wurde zu einer Reaktionsmischung mit 100 μM ATP und 2 mM Magnesium 0.19 μM Protein zugegeben (Standardbedingungen), der Ansatz halbiert und parallel 10 min im Dunkeln und eine Minute in blauem Licht gehalten. Die Reaktion wurde durch Denaturieren der Proben 10 min bei 95 °C gestoppt. Die Nukleotid-Analyse der Dunkelprobe zeigt einen großen Anteil an unverbrauchtem Substrat und nur eine geringe Produktmenge (Abbildung 2.18). Im Licht wurde dagegen mehr als die Hälfte des ATPs zu cAMP umgesetzt und belegt die lichtabhängige Adenylatzyklase-Aktivität von bPAC *in vitro*.

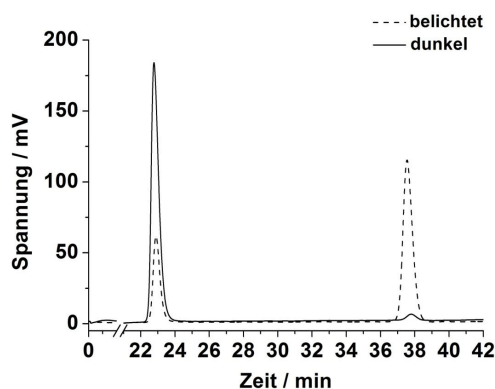


Abbildung 2.18: Lichtinduzierte Zyklaseaktivität von bPAC

Substratumsatz durch bPAC im Dunkeln (schwarz) und im Licht (gestrichelt). 0.19 μM Protein wurden mit 100 μM Substrat 10 min im Dunkeln oder 1 min im Blaulicht ($\lambda = 456 \text{ nm}$) inkubiert und anschließend auf ihren Nukleotidgehalt untersucht.

2 Ergebnisse

Die Quantifizierung geringer Nukleotidmengen ist fehleranfällig, was im vorliegenden Fall insbesondere für die als Referenz notwendige Dunkelkontrolle gilt. Aufgrund der großen Differenz zwischen den im Licht und im Dunkeln umgesetzten Substratmengen, wurden die Testbedingungen im Dunkeln durch Erhöhung der Proteinkonzentration und der Inkubationszeit so angepasst, dass die entstehende Produktmenge größer als 0.3 nmol cAMP pro Auswertungsvolumen war. Für die Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der nPACs und später der bPAC-Varianten war es darüber hinaus erforderlich, auch die Testbedingungen im Licht zu variieren. Abweichende Bedingungen sind vermerkt und entsprechend in die spezifische Aktivität eingerechnet. Da sich die entstehende Produktmenge jedoch nicht proportional zu eingesetzten Proteinkonzentration und zur Inkubationszeit verhält (siehe Anhang 0.4), werden abhängig von den Testbedingungen unterschiedliche spezifische Aktivitäten und Licht-zu-Dunkelverhältnisse für bPAC erhalten.

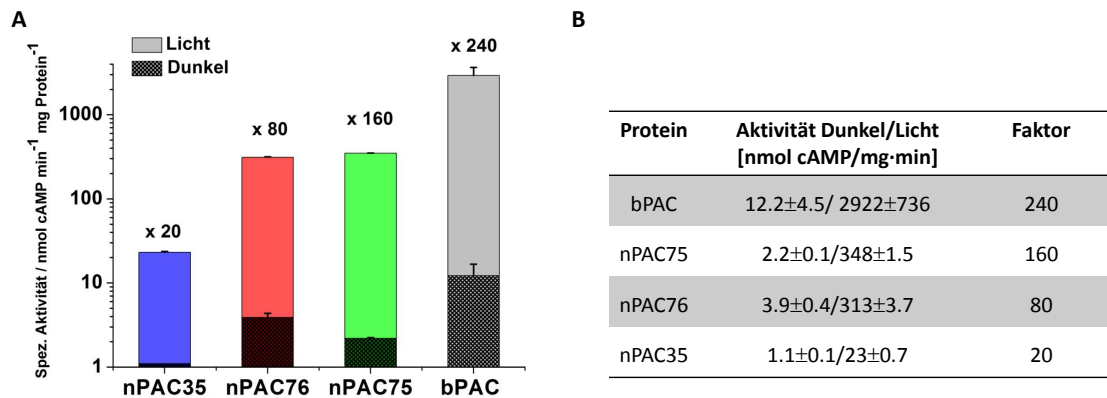


Abbildung 2.19: Spezifische Adenylatzyklase-Aktivitäten kleiner PACs im Dunkeln und im Licht

A Für die Ansätze wurden folgende Proteinkonzentrationen eingesetzt: bPAC Dunkel und Licht 0.19 μ M, nPAC76 Dunkel und Licht 0.61 μ M Protein, nPAC35 Dunkel 1.34 μ M und Licht 2 μ M Protein, nPAC75 Dunkel 1.3 μ M und Licht 0.65 μ M Protein. Die Dunkelaktivität wurde über 60 min, die Lichtaktivität wurde über 1 min bestimmt. Alle Werte sind Mittelwerte aus einer Zwei- bzw. Dreifachbestimmung; die Lichtaktivität bPACs wurde aus n=5 bestimmt. **B** Die Tabelle enthält die spezifischen Licht- und Dunkelaktivitäten kleiner PACs, sowie die Faktoren der Lichtaktivierung.

Die Aktivitäten von bPAC und den drei nPACs wurden nach Inkubation für 60 min im Dunkeln und nach einer Minute Belichtung bestimmt. Alle vier kleinen PACs haben mit spezifischen Aktivitäten im Bereich von 1-12 nmol cAMP · min⁻¹ · mg⁻¹ geringe Dunkelaktivitäten. Diese Werte entsprechen Umsatzzahlen von k_{cat} = 0.001-0.01 cAMP/s. bPAC

besitzt mit $2922 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ($k_{cat} = 2.6 \text{ cAMP/s}$) im Vergleich die höchste Lichtaktivität (Abb. 2.19). Dies ergibt eine ca. 240-fache Steigerung der Aktivität im Licht.

Die drei nPACs haben im Vergleich zu bPAC zwar geringere spezifische Dunkelaktivitäten (1 bis $4 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, $k_{cat} = 0.001\text{-}0.004 \text{ cAMP/s}$, siehe Tab. 2.19), besitzen aber auch wesentlich geringere Lichtaktivitäten: nPAC75/nPAC76/nPAC35=350/310/23 $\text{nmol cAMP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Das ergibt Licht-zu-Dunkel-Verhältnisse von nPAC75/nPAC76/nPAC35=160/80/20. Der erhöhte Fehler für die Aktivitäten von bPAC kommt durch die Mitberücksichtigung von Werten an wiederaufgetautem Protein zu Stande.

Die Resultate der *in vitro*-Analyse bestätigen die Licht-Aktivierbarkeit der vier PACs. Die Aktivität bPACs korreliert eindeutig mit der Stärke der lichtinduzierten Zellantworten in den drei *in vivo*-Funktionstests und begründet ihre Eignung als zellmanipulierendes Werkzeug. bPAC besitzt im Vergleich zu den nPACs die höchste Lichtaktivität und das beste Licht-zu-Dunkel-Verhältnis. Zusätzlich machen die geringe Basalaktivität und die Rückkehrkinetik im unteren Sekunden-Bereich bPAC zu einem bevorzugten Kandidaten für die Anwendung. Aus diesen Gründen wird das Aktivitätsverhalten von bPAC im folgenden Abschnitt ausführlicher charakterisiert.

Charakterisierung des Aktivitätsverhaltens von bPAC

Für die biotechnologische Nutzung von bPAC ist es bedeutsam, die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von zellulären und experimentellen Faktoren wie z.B. Lichtintensität, Substratkonzentration, pH-Wert oder Temperatur zu kennen. Auch die Dynamik der Zyklase-Aktivität nach Lichtanregung ist für den Anwender eine wichtige Information, da sie direkten Einfluss auf den Zeitverlauf der Zellantwort nimmt. Diesen Punkten soll in den kommenden Abschnitten nachgegangen werden.

Die Bestimmung der Zyklase-Aktivität *in vitro* wurde bei einer Standardsubstratkonzentration von $100 \mu\text{M}$ durchgeführt. Abweichend davon liegen physiologische ATP-Konzentrationen gewöhnlich im Bereich von 4-5 mM. Um die Aktivität von bPAC unter physiologischen Bedingungen abzuschätzen, wurde die von der Substratkonzentration abhängige Enzymaktivität bestimmt.

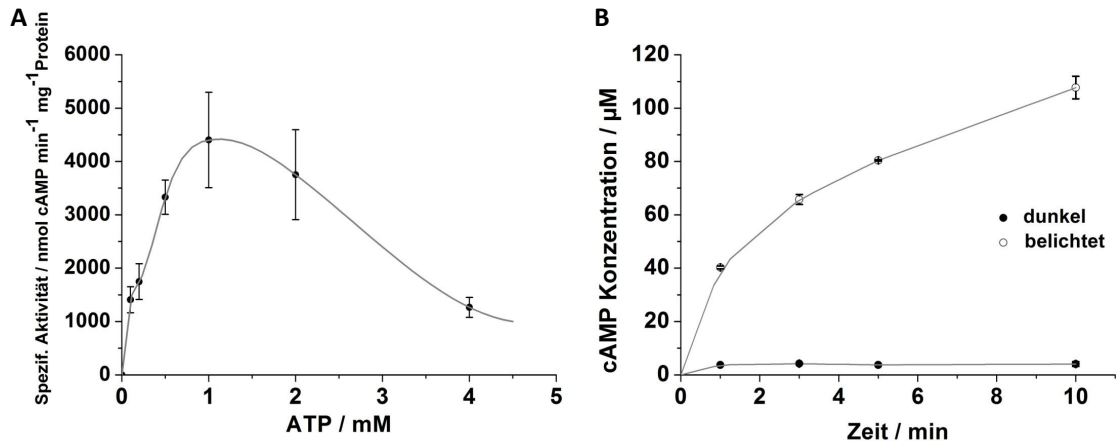


Abbildung 2.20: Substratabhängigkeit und Enzymverhalten von bPAC unter dauerhafter Belichtung

A Abhängigkeit der spezifischen Aktivität bPACs von der Substratkonzentration. Die Konzentration bei halbmaximaler Aktivität beträgt 0.3 mM. Die dargestellten Aktivitäten wurden aus dem Substratumsatz nach 2-minütiger Belichtung erhalten. **B** Zeitliche Entwicklung der Produktbildung im Dunkeln oder unter kontinuierlicher Belichtung. Für die Bestimmung der Dunkelwerte kamen 1 μ M Protein, für die Bestimmung der Lichtwerte 0.19 μ M gereinigtes Protein zum Einsatz. Dargestellt sind Mittelwerte aus einer Zweifachbestimmung mit Standardabweichung.

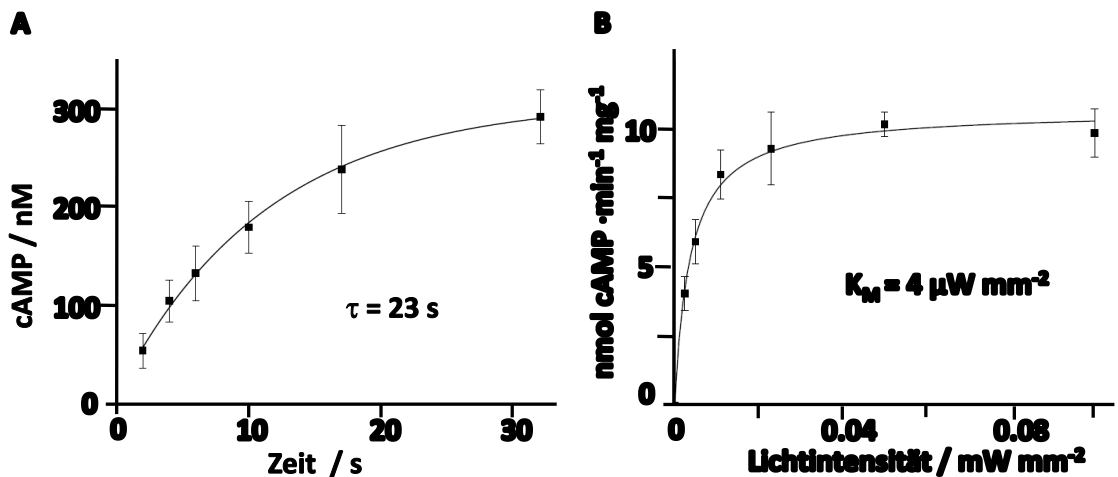


Abbildung 2.21: Enzymkinetik und Lichtsättigung von bPAC nach Lichtpulsen

A Produktzunahme im Anschluss an einen 4 s LED-Lichtpuls ($\lambda = 475$ nm) in 300 mM KCl, 50 mM Tris-Hepes, pH 7.4, 21 °C, $n = 3$. Zeitverlauf entspricht einem Abklingverhalten der Aktivität mit einer Zeitkonstante von $\tau = 23$ s. **B** Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Lichtintensität. Bedingungen vgl. A. Nach Belichtung für 1 min wurde die Reaktion durch Zugabe des 9-fachen Volumens 0.1 M HCl gestoppt und die cAMP-Konzentration mittels eines EIA bestimmt. Aufgetragen sind Mittelwerte aus einer Doppelbestimmung mit Standardabweichung, die durch eine Michaelis-Menten-Kurve angefitzt wurden. Halbmaximale Sättigung wird bei einem $K_M = 4 \mu\text{W} \cdot \text{mm}^{-2}$ erreicht. Die Experimente wurden von G. Nagel durchgeführt und sind ursprünglich in [156] publiziert. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

Bei steigenden Substratkonzentrationen zeigt bPAC zunächst zunehmende Aktivität (Abbildung 2.20 A). Die halbmaximale Aktivität wird bei einer ATP-Konzentration von 0.3 mM erreicht. Ab 2 mM tritt eine Substrat- oder Produkthemmung der Aktivität ein. Dies würde unter physiologischen Bedingungen die cAMP-Bildung unterdrücken. Die Erzeugung permanent erhöhter cAMP-Spiegel in Zellen erfordert eine kontinuierliche Beleuchtung der Zellen. Um das Enzymverhalten und insbesondere die Enzymstabilität für diese Zwecke zu testen, wurde der Substratumsatz durch bPAC unter anhaltender Beleuchtung bzw. in Dunkelheit verfolgt. Während der 10-minütigen Beleuchtung nimmt die Produktmenge stetig zu, erreicht im Versuchszeitraum jedoch keinen vollständigen Substratumsatz (Abbildung 2.20 B). Dies weist die Stabilität von bPAC unter kontinuierlicher Beleuchtung nach. Im Dunkeln verbleibt die Aktivität gleichbleibend auf niedrigem Niveau.

Für Anwender, die bPAC zur Erzeugung transient erhöhter cAMP-Spiegel einsetzen wollen, ist speziell das Enzymverhalten bPACs nach kurzen Lichtpulsen von Interesse. Vor diesem Hintergrund führte Prof. Georg Nagel (Universität Würzburg) die im Folgenden beschriebenen Experimente durch. Dazu wurde ihm präpariertes bPAC bereitgestellt. Verfolgt man die Produktbildung im Dunkeln nach 4 s Blaulicht, so hält diese auch nach Anregung über einen Zeitraum von mehreren Sekunden an (Abbildung 2.21 A). Dabei ist das Sättigungsverhalten ein Maß für das Abklingen der Aktivität nach Beleuchtung. Legt man eine exponentielle Produkt-Zunahme zu Grunde, ergibt sich eine Inaktivierungs-Zeitkonstante von $\tau=23$ s. Dieser Ablauf korreliert zeitlich mit dem Zerfall des rotverschobenen Intermediates ($\tau=15$ s) und legt nahe, dass der rotverschobene Zustand die biologische aktive Zyklase und den Signalzustand von bPAC repräsentiert.

Testet man die bPAC-Aktivität bei zunehmenden Lichtintensitäten, so ergibt sich, dass sie einer Michaelis-Menten Kinetik folgt (Abbildung 2.21 B). Die Konstante der halbmaximalen Sättigung beträgt $4 \mu\text{W}\cdot\text{mm}^{-2}$.

Einen Einfluss auf die Enzymaktivität haben daneben auch pH-Wert und Temperatur. Da diese Parameter in zellulärer Umgebung streng reguliert sind, ist die Kenntnis über deren Abhängigkeit von praktischer Bedeutung. Die Abhängigkeit der bPAC-Aktivität von pH-Wert und Temperatur ist in Abbildung 2.22 A und B gezeigt. bPAC besitzt eine maximale Aktivität im leicht basischen Bereich (pH 8-9.5). Dagegen ist die Aktivität bei pH-Werten kleiner 7.5 und größer 10 reduziert. Das Temperaturoptimum der Lichtaktivität von bPAC liegt bei 50 °C. Dies ist für ein Protein aus einem marinen Bakterium ein unerwartet hoher Wert.

Über die typischen Enzymkenngrößen hinaus wurde der Einfluss weiterer Faktoren auf

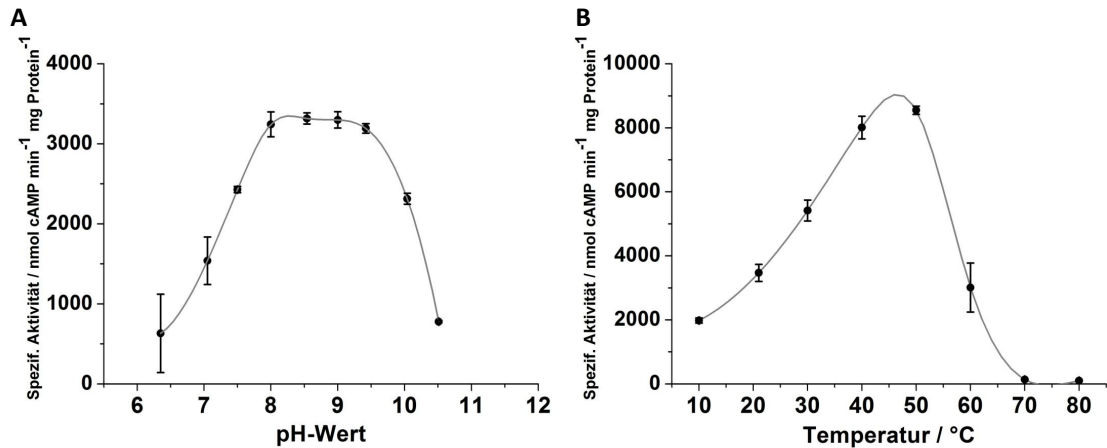


Abbildung 2.22: pH- und Temperaturabhängigkeit der Lichtaktivität von bPAC

A Abhängigkeit der spezifischen Aktivität bPACs vom pH-Wert. Das pH-Optimum liegt zwischen pH 8-9. **B** Abhängigkeit der spezifischen Aktivität bPACs von der Temperatur. Die maximale Aktivität wird bei ca. 50 °C erreicht. Alle Werte wurden unter Standardbedingungen erhalten und sind Mittelwerte aus einer Dreifachbestimmung mit Standardabweichung.

die Aktivität von bPAC festgestellt: Die Anwesenheit von Reduktionsmitteln in der Proteinpräparation wirkt sich vorteilhaft auf die Zykase-Aktivität aus. Durch Zugabe von 5 mM β -Mercaptoethanol zur Proteinprobe wurde eine Steigerung der spezifischen Aktivitäten bis auf den 6-fachen Wert erreicht (siehe Anhang 0.5). Nach der Strukturvorhersage besitzt bPAC mehrere Oberflächencysteine; der Einfluss von Mercaptoethanol ließe sich damit auf eine Stabilisierung bPACs durch seine reduzierende Wirkung erklären. Ein vergleichbarer Trend wurde auch bei nPAC76 beobachtet. In weiteren Ansätzen wurde der Einfluss des Adenylatzyklase-Aktivators Forskolin auf bPAC getestet. Die Aktivität von bPAC ist im Beisein des Effektors (100 μ M) unverändert, was nahelegt, dass Forskolin keinen Einfluss auf die Adenylatzyklase-Aktivität von bPAC hat. Im Gegensatz zu eukaryotischen Zykassen, die neben einem aktiven Zentrum ein zweites regulatorisches Zentrum besitzen, weist bPAC vermutlich zwei katalytisch aktive Zentren auf. Aufgrund dieser strukturellen Beschaffenheit besitzt bPAC keine allosterische Bindungsstelle, die die aktivierende Wirkung Forskolins begründen würden.

Ein weiterer wichtiger Punkt für die Bewertung der Ergebnisse dieser Arbeit ist der Einfluss des SUMO-Fusionsproteins auf die enzymatische Aktivität von bPAC. Nachdem durch die Kooperation mit dem MPI Heidelberg die Präparation von rekombinantem bPAC ohne SUMO möglich war, wurde die Aktivität beider Proteine im Vergleich getestet. Im Dunkeln ergibt sich für SUMO-bPAC eine Aktivität von 332, für das His-getaggte bPAC ein Wert von 229 nmol cAMP \cdot min⁻¹ \cdot mg⁻¹. Im Licht liegt der Ak-

2.3 Anwendungsrelevante Unterschiede zwischen bPAC und euPAC α

tivitätsdurchschnitt für SUMO-bPAC bei $2242 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ und für bPAC bei $3213 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Die Ergebnisse wurden unter Verwendung von $0.6 \mu\text{M}$ Protein und 1-minütiger Inkubation im Dunkeln sowie von $0.1 \mu\text{M}$ (bPAC) und $0.19 \mu\text{M}$ (SUMO-bPAC) und bei einer durchschnittlichen Inkubationszeit von 4 min im Licht erhalten (siehe Anhang 0.4). Die vergleichenden Untersuchungen ergaben, dass die Gegenwart von SUMO die Eigenschaften bPACs dahingehend modifiziert, dass es den Abstand zwischen Dunkel- und Lichtaktivität vermindert. Die reduzierte Aktivitätsspanne des SUMO-Fusionskonstruktes ist bei der Bewertung der *in vitro* erzielten Ergebnisse zu bedenken. Dies deutet darauf hin, dass die für optogenetische Anwendungen wichtige Aktivitätsspanne bPACs größer ist, als sie in der vorliegenden Arbeit *in vitro* gemessen werden konnte. Aufgrund des fortgeschrittenen Stadiums der Arbeit wurde von einer Wiederholung aller betreffenden Messungen abgesehen. Um eine mögliche Nebenaktivität von bPAC als Guanylatzyklase auszuschließen, führte Prof. G. Nagel die Aktivitätsbestimmung *in vitro* auch mit GTP durch. Eine Entstehung von cGMP konnte nicht nachgewiesen werden (pers. Kommunikation); dies zeigt, dass es sich bei bPAC um eine spezifische Adenylatzyklase handelt.

Zusammenfassend konnten im Rahmen der beschriebenen Charakterisierung verschiedene anwendungsrelevante Enzymkenngrößen von bPAC bestimmt werden. Die bPAC-Aktivität besitzt ein Temperaturoptimum bei nahezu 50°C und ein pH-Optimum im basischen Bereich. bPAC ist ein lichtsensitives Enzym mit einer halbmaximalen Sättigung bei $4 \mu\text{W} \cdot \text{mm}^{-2}$. Die Enzymaktivität klingt mit einer Zeitkonstante von 23 s ab und korreliert mit der Lebenszeit des rotverschobenen Zustandes (15 s). Bei ATP-Konzentrationen um 1 mM ist bPAC maximal aktiv. Unter höheren ATP-Konzentrationen erfährt ihre Aktivität eine Inhibierung.

2.3 Anwendungsrelevante Unterschiede zwischen bPAC und euPAC α

Bei der Einführung lichtregulierter Enzyme muss neben der funktionalen Expression in verschiedenen Zellsystemen und der Bestimmung anwendungsspezifischer Parameter auch eine Gegenüberstellung mit bereits genutzten Werkzeugen erfolgen. Um einen quantitativen und detaillierten Vergleich mit euPAC α aus *Euglena gracilis* durchzuführen, wurde bPAC verschiedenen Anwendern zur Verfügung gestellt. Im Folgenden sind die Ergebnisse beschrieben, die im Rahmen dieser Kooperationen erzielt und publiziert werden konnten [156].

2.3.1 bPAC besitzt in *Xenopus*-Oozyten eine große dynamische Breite

2007 berichteten Schröder-Lang und Mitarbeiter erstmals über den Einsatz der beiden euPAC-Untereinheiten aus *Euglena gracilis* als zellmanipulierendes Werkzeug [145]. In ihrer Arbeit zeigten sie insbesondere die Eignung von euPAC α zur optischen Kontrolle zellulärer cAMP-Spiegel und demonstrierten dies in *Xenopus*-Oozyten, in HEK293-Zellen und in *Drosophila*-Fliegen.

Dazu wurden unter anderem euPAC α -exprimierende Oozyten belichtet und anschließend die Gesamtmenge an cAMP pro Zelle mittels eines ELISA bestimmt. Gegenüber der Kontrolle war der cAMP-Spiegel durch euPAC α bereits im Dunkeln 20-fach erhöht. 5-minütige Belichtung bewirkte eine weitere Steigerung auf das 10-fache, siehe Abbildung 2.23 A.

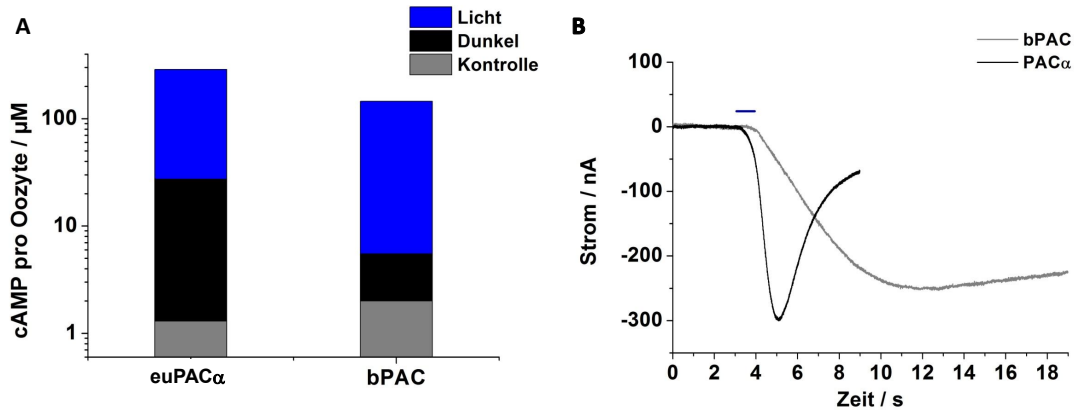


Abbildung 2.23: Lichtinduzierte cAMP-Produktion in PAC-exprimierenden *Xenopus*-Oozyten

A cAMP-Spiegel in *Xenopus*-Oozyten vor und nach PAC-Anregung. 4 Tage nach der Injektion von 2 ng bPAC bzw. 3 ng euPAC α bestimmte G. Nagel die Gesamtmenge an cAMP in einzelnen Oozyten mittels eines EIAs [145]. Im Dunkeln (schwarz) lag die cAMP-Konzentration in euPAC α -exprimierenden Oozyten 20-fach, in bPAC-exprimierenden Oozyten weniger als 2-fach oberhalb der von Kontrollloozyten (grau). Belichtung mit einer LED 475 nm (blau) führte zu einer weiteren 10-fachen bzw. 100-fachen cAMP-Steigerung in euPAC α bzw. bPAC-Zellen bezogen auf die Differenz zwischen Dunkelwert und Kontrolle. Die Belichtungsdauer für euPAC α betrug 5 min, die für bPAC dauerte 1 min an. **B** Verlauf CNG-vermittelter Photoströme in bPAC- und euPAC α -exprimierenden Oozyten. Unter äquivalenten Expressions- und Anregungsbedingungen bewirkt euPAC α (schwarz) eine schnellere Aktivierung der Ströme und ruft kurzlebige Antworten als bPAC (grau) hervor. Die Oozyten wurden in einem molekularen Verhältnis von 1:100 injiziert, für 1 s beleuchtet und bei konstanter Klemmspannung von -40 (bPAC) bzw. -70 mV (euPAC α) gemessen.

2.3 Anwendungsrelevante Unterschiede zwischen bPAC und euPAC α

In einem vergleichbaren Ansatz bestimmte Prof. G. Nagel (Universität Würzburg) die cAMP-Menge in bPAC-exprimierenden Oozyten. Am 4. Expressionstag betrug die Konzentration an cAMP im Dunkeln $3.5\ \mu\text{M}$ und lag damit $1.5\ \mu\text{M}$ oberhalb des Kontrollwertes von $2\ \mu\text{M}$. In belichteten Zellen stieg die cAMP-Menge mit der applizierten Lichtmenge an und ergab einen Michaelis-Menten ähnlichen Kurven-Verlauf (siehe Anhang 0.6). Unter Berücksichtigung der physiologischen cAMP-Menge wurde eine 100-fache Steigerung der cAMP-Konzentration ($140\ \mu\text{M}$) erreicht.

Mit dem Ziel den zeitlichen Verlauf lichtinduzierter cAMP-Produktion zu bestimmen, wurden bPAC und euPAC α unter vergleichbaren Expressionsbedingungen im Oozyten-Assay getestet. Um besonders den Anstieg der Stromkurven auflösen zu können, wurden die Messungen unter kontinuierlicher Spannung ausgeführt. In beiden Fällen entstehen reversible Photoströme (Abbildung 2.23 B). Während die CNG-Ströme in den euPAC α -exprimierenden Oozyten bereits 0.2 s nach Beleuchtungsbeginn ansteigen, 2 s später ihren Spitzenwert erreichen und 6 s später größtenteils zurückgegangen sind, setzen bPAC-vermittelte Ströme nach 0.5 s ein, wachsen innerhalb von 8 s auf vergleichbare Maxima an und klingen im Verlauf von Minuten ab (siehe Kapitel 2.1.2). Insgesamt repräsentieren bPAC-induzierte Ströme eine größere Menge transferierter Ionen. Während sich das langsame Abklingen der bPAC-Ströme aus der Kinetik der Enzyminaktivierung und ihrem hohen Substratumsatz ergibt, kann das verzögerte Einsetzen der Ströme auf eine langsamere Enzymaktivierung oder auf unterschiedliche Lokalisation der Photorezeptoren (zytosolisch vs. membran-assoziiert) zurückzuführen sein.

2.3.2 bPAC zeigt in Ratten-Neuronen eine hohe lichtinduzierte cAMP-Produktion

Der Erfolg der Optogenetik in den Neurowissenschaften und die medizinische Bedeutung cAMP-gesteuerter Prozesse in Neuronen macht eine Anwendung von bPAC in Nervengewebe interessant. Die optische Kontrolle von cAMP durch PAC ermöglicht das Erforschen neuronaler Signaltransduktion und Reifung, sowie synaptischer Plastizität. In Kombination mit cAMP-sensitiven Kationenkanälen kann PAC dazu verwendet werden, Neuronen lichtabhängig zu depolarisieren und somit Aktionspotentiale zu stimulieren [179]. Speziell vor diesem Hintergrund unternahm Daniel Udvari (AG Thomas Oertner, ZMNH Hamburg) vergleichende Experimente mit bPAC und euPAC α in Schnittkulturen von Hippocampus-Neuronen aus *Wistar*-Ratten-Gehirnen.

In einem ersten Expressions- und Funktionalitätstest wurden bPAC und cAMP-sensitive CNG-Kanäle (CNG-A2-C460A-E583M) mit rot-fluoreszierendem Protein (RFP) in die

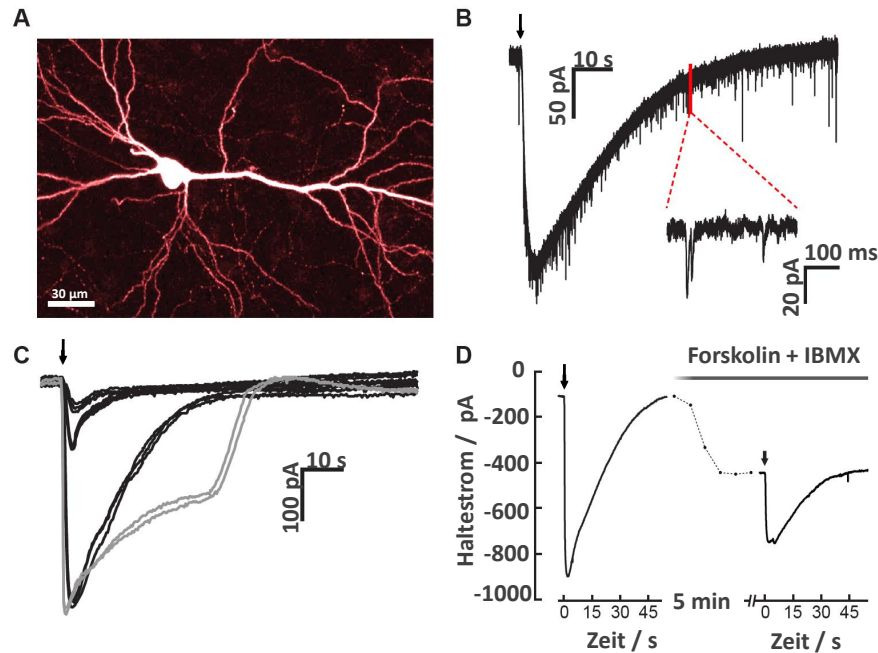


Abbildung 2.24: bPAC-Funktionsassay in Hippocampus-Neuronen

A Gezeigt ist ein CA1 pyramidales Neuron, welches bPAC, CNG-A2 und RFP exprimiert. RFP-Anregung erfolgte durch Zwei-Photonen-Anregung bei 980 nm. **B** Photostrom in einem bPAC und CNG-Kanal exprimierenden Neuron. Der Ausschnitt zeigt die Überlagerung der CNG-Ströme durch intrinsische neuronale Aktivität. Die Anregung (Pfeil) erfolgte bei $I=0.14 \text{ mW} \cdot \text{mm}^{-2}$ für 100 ms. **C** bPAC-vermittelte Photoströme in einem Neuron bei vier verschiedenen Lichtdosen (schwarz $0.14 \text{ mW} \cdot \text{mm}^{-2}$ für 50, 100 und 1000 ms, grau 1 s $109 \text{ mW} \cdot \text{mm}^{-2}$). Überlagerte postsynaptische Ströme wurden mit einem 10 Hz Tiefpass entfernt. Sättigung der CNG-Ströme wurde bei $0.14 \text{ mW} \cdot \text{mm}^{-2}$ erreicht. **D** Lichtinduzierte CNG-Ströme vor und unter Einwirkung pharmakologischer Agenzien. 5-minütige Einwirkzeit von $100 \mu\text{M}$ Forskolin und IBMX führen zur Vergrößerung des Haltestroms (von -108 pA auf -446 pA), verhindern jedoch lichtinduzierte Ströme nur teilweise. Die Experimente wurden in der AG Oertner durchgeführt und sind ursprünglich in [156] publiziert. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

Neuronen eingebracht. Die RFP-Koexpression ermöglicht die Selektion transfizierter Neuronen in einem Wellenlängenbereich oberhalb der bPAC Anregung. Abbildung 2.24 A zeigt die Fluoreszenzaufnahme eines pyramidalen Neurons 1 Tage nach Transfektion. Die bPAC-, CNG-A2- und RFP-exprimierenden Neuronen erscheinen morphologisch unauffällig und sind vital.

Nach Applikation eines 100 ms-Lichtpulses beobachtet man große, cAMP-abhängige Photoströme, die durch den enzymatischen Abbau in den Neuronen bereits nach 0.5 s wieder auf das Ausgangsniveau zurückkehren (siehe Abbildung 2.24 B). Unter den gewählten experimentellen Bedingungen sind die erzeugten Photoströme ausreichend, um Aktionspotentiale hervorzurufen.

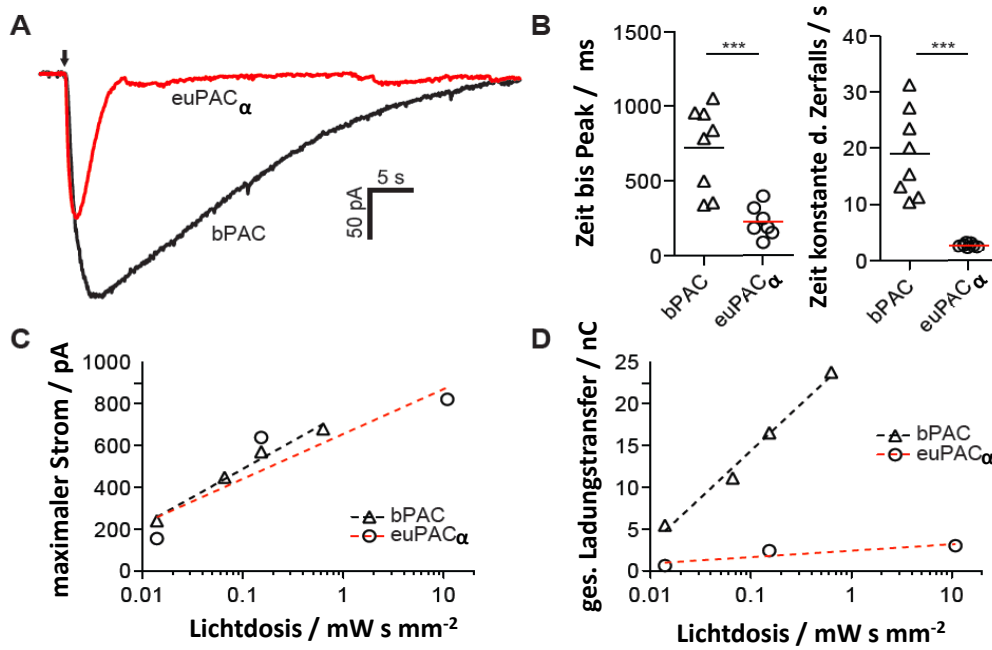


Abbildung 2.25: Funktionaler Vergleich zwischen bPAC und euPAC α in CNG-Kanal koexprimierenden Ratten-Neuronen

A Lichtinduzierte CNG-Ströme in bPAC-(schwarz) und euPAC α -(rot) exprimierenden Neuronen, die mit gleicher Menge an PAC- und CNG-Kanal-DNA transfiziert wurden. Nach 100 ms-Anregung (140 $\mu\text{W}\cdot\text{mm}^{-2}$) vermittelt bPAC länger anhaltende CNG-Ströme als euPAC α . **B** Die Zeit bis zum Erreichen des halbmaximalen Stroms und die Zerfallszeit bPAC-induzierter Photoströme ist größer als bei euPAC α (bPAC n=8, euPAC α n=7, *** p<0.001). **C** Die Abhängigkeit des Maximalstromes von der Lichtdosis ist in bPAC- und euPAC α -exprimierenden Neuronen vergleichbar. **D** Der Gesamtladungstransfer (integrierter Strom) in Abhängigkeit der Lichtintensität ist in bPAC-exprimierenden Neuronen etwa 8-fach größer als in euPAC α -exprimierenden Neuronen. Die Experimente wurden von D. Udvari in der AG Oertner durchgeführt und sind ursprünglich in [156] publiziert. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

Eine Steigerung der Lichtmenge vermag die Ströme sowohl in ihrer Amplitude als auch in ihrer Dauer weiter zu vergrößern (siehe Abbildung 2.24 C). Lichtsättigung der CNG-Kanäle wurde bei einer Intensität von 100 $\text{mW}\cdot\text{mm}^{-2}$ erzielt. Dabei treten Stromspitzen bis zu 3 s nach Belichtung auf; die Effekte klingen innerhalb von 1 min ab.

Um die Effektivität der Depolarisation durch bPAC mit der Wirkung herkömmlicher pharmakologischer Agenzien vergleichen zu können, wurden Neuronen den cAMP-stimulierenden Verbindungen Forskolin und IBMX ausgesetzt (siehe Abbildung 2.24 D). Chemische Anregung bPAC-exprimierender Neuronen ruft langsam ansteigende und kleine CNG-Ströme hervor, die nicht reversibel sind. Trotz dadurch zunehmender Permeabilität der Neuronen lassen sich lichtinduzierte Ströme hervorrufen. Dies verdeutlicht die

effiziente cAMP-Bereitstellung durch bPAC.

Um bPAC und euPAC α in ihren enzymatischen Eigenschaften voneinander abzugrenzen, wurden PAC-induzierte CNG-Stromkurven hinsichtlich ihrer Amplitude und ihres Auftretens unter äquivalenten Bedingungen bewertet. Vergleichbar mit den Befunden in Oozyten ergeben sich auch für PAC-exprimierende Neuronen folgende Merkmale der Photoströme (Abb. 2.25 A und B): Die Zeitspanne zwischen Beleuchtungsstart und 50 %-Wert des Stromes ist in bPAC mit 723 ± 101 ms größer als in euPAC α (227 ± 40 ms). Auch erreichen bPAC-induzierte CNG-Ströme ihr Maximum später und benötigen die 6-fache Zeit, um auf ihr Ausgangsniveau zurückzukehren (Zeitkonstante für die Rückkehr zum Stromausgangswert $\tau_{off} = 19.0 \pm 2.8$ s (bPAC) gegenüber $\tau_{off} = 2.7 \pm 0.1$ s (euPAC α), siehe Abb. 2.25 B). Für beide Neuronenarten war der unter nicht-sättigender Beleuchtung erreichte Maximalwert vergleichbar hoch (Abb. 2.25 B und C). Infolge der kinetischen Parameter repräsentieren die für die bPAC-Neuronen gemessenen Stromkurven erneut einen signifikant höheren Ladungstransfer (Abb. 2.25 D). Im Umkehrschluss ist für die Erzeugung vergleichbarer cAMP-Mengen durch euPAC α eine 3-fach höhere Lichtintensität nötig.

2.3.3 bPAC besitzt im *Drosophila*-ZNS eine geringere Dunkelaktivität und erzielt lang anhaltende Effekte

Der Effekt von lichtinduzierter cAMP-Erhöhungen wurde erstmals durch Anwendung von euPAC α im Zentralnervensystem der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* erprobt [145]. Die über den Neuronen-spezifischen Promoter *elav-Gal4* gesteuerte Expression von PAC führte zu Blaulicht induziertem Hyperaktivitätsverhalten und unnatürlichem Erstarren der Fliege. Für eine quantitative Analyse zogen Schröder-Lang und Kollegen den sogenannten *Grooming*-Reflex heran: Das Bedecken der Fliegen mit einem feinen Puder löst unmittelbare und bis zu 30 min anhaltende Putzaktivität aus. Werden PAC transgene Fliegen innerhalb dieser Phase photostimuliert, so reagieren sie mit Hyperaktivität und deutlich verminderter Putzaktivität. Diese Verhaltensänderung ist reversibel; nach charakteristischer Zeit nehmen die Fliegen ihre ursprüngliche Putzaktivität wieder auf. Für die Bewertung von bPAC gegenüber euPAC α wurde das Verhalten transgener Fliegen nach Lichtanregung untersucht. Dazu wurde die Zeit nach Belichtung bis zum Einsetzen des lichtinduzierten Effektes, als auch die Zeit bis zum Nachlassen des Effektes ausgewertet. Nachfolgend beschriebene Experimente wurden durch Linda Petereit und Marina Efetova unter Anleitung von Dr. Martin Schwärzel (FU Berlin) ausgeführt. Abbildung 2.26 B stellt die Zeit bis zum Einsetzen und Wiederabklingen des Photoeffektes in euPAC α - und bPAC-exprimierenden Fliegen dar. Während bPAC nach Anregung

eine schnelle Unterbrechung der Putzaktivität vermittelt, setzt der Effekt in euPAC α -Fliegen verzögert ein (in bPAC 4 s vs. euPAC α 12 s). Darüber hinaus hält der Effekt in bPAC-exprimierenden Fliegen signifikant länger an (in bPAC 34 s vs. euPAC α 5 s).

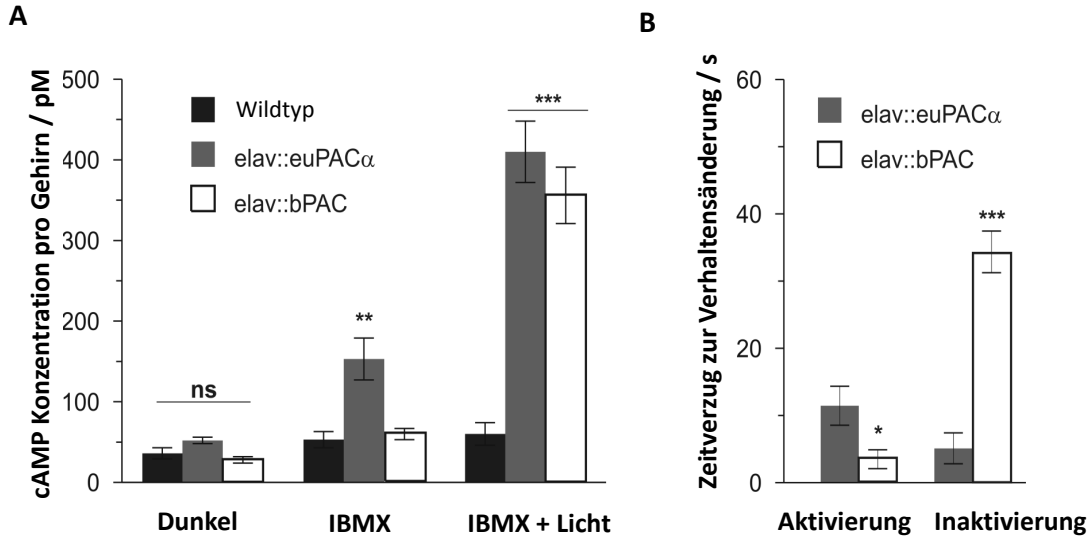


Abbildung 2.26: Funktionaler Vergleich zwischen bPAC und euPAC α in transgenen *Drosophila*-Fliegen

A cAMP-Spiegel im *Drosophila*-ZNS nach Expression von bPAC-(*elav::bPAC*) und euPAC α -(*elav::euPAC α*) Transgenen. Im Vergleich zu Wildtyp Canton-S Kontrollfliegen und zu bPAC-exprimierenden Fliegen ruft euPAC α -Expression eine Dunkelaktivität hervor, die besonders unter Einwirkung des Phosphodiesterase-Inhibitors IBMX (100 μ M) deutlich wird. Lichtanregung (5 min, 455 nm, 40 mW \cdot mm $^{-2}$) beider transgener Linien erzielte eine weitere 10-fache Steigerung auf vergleichbare cAMP-Niveaus (je n=11). **B** Aktivierung und Inaktivierung von licht-induzierten Verhaltensänderungen in PAC-transgenen Fliegen. Belichtung führt zur kurzzeitigen Unterbrechung der Putzaktivität durch Erstarrungs-Perioden. Der Effekt setzt in bPAC-exprimierenden Fliegen schneller ein und hält signifikant länger an (je n= 11). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. Die Experimente wurden in der AG Schwärzel durchgeführt und sind ursprünglich in [156] publiziert. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

Um eine Abschätzung für die Dunkelaktivität der PACs in *Drosophila* zu erhalten, wurde die cAMP-Konzentration in Gehirnen der transgenen Tiere bestimmt. In PAC-exprimierenden *Drosophila*-Fliegen sind cerebrale cAMP-Konzentrationen im Dunkeln unauffällig, weisen aber unter IBMX-Einwirkung auf eine basale Aktivität ausschließlich von euPAC α hin (Abbildung 2.26 A). Photoaktivierung bewirkt einen signifikanten Anstieg der cAMP-Niveaus; dabei sind die erreichten Konzentrationen vergleichbar hoch. In Bezug auf die lichtinduzierte Steigerung vermittelt bPAC größere Effekte.

bPAC besitzt gegenüber euPAC α vorteilhafte Anwendungseigenschaften

Der direkte Vergleich zwischen bPAC und euPAC α zeigt, dass beide PACs als optogenetische Werkzeuge geeignet sind, cAMP-Spiegel zu erhöhen und das Verhalten von Tieren zu kontrollieren. Darüber hinaus bedingen die jeweiligen Enzymeigenschaften den Verlauf, die Stärke und die Dauer der induzierten Lichteffekte. Konkret weist bPAC in Oozyten und in *Drosophila* eine geringere Basalaktivität als euPAC α auf. Die Experimente in Neuronen, Fruchtfliegen und Oozyten machen deutlich, dass bPAC stärkere und länger anhaltende Antworten erzielt, die auf eine größere lichtinduzierte cAMP-Produktion zurückzuführen sind.

Aufgrund dieser Merkmale stellt bPAC für optogenetische Anwendungen, die bei geringer Anregung maximale Effekte erzielen wollen, die bessere Alternative dar. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass die langsamere Inaktivierung von bPAC (23 s vs. \approx ms) die zeitliche Steuerbarkeit lichtstimulierter Effekte einschränkt.

2.4 Funktionelle Analyse und anwendungsbezogene Optimierung von bPAC

Mit der Etablierung eines neuen optogenetischen Werkzeugs besteht auch aus Anwendersicht zunehmendes Interesse daran, ein generelles Verständnis für die Funktion des Photorezeptors zu entwickeln. Dafür ist es bedeutsam, wichtige Strukturelemente zu identifizieren, deren Beitrag zu Photochemie, Signaltransduktion oder Rezeptoraktivität zu kennen und diesen in Kontext mit der Gesamtfunktion zu setzen. Photorezeptoren sind modular aufgebaute Systeme. Diese Betrachtung stellt zunehmend auch Fragen der Kombinierbarkeit verschiedener Module in den Mittelpunkt der Überlegungen [110]. Um auf diese Weise neue synthetische Rezeptoren rational zu entwerfen, aber auch um gezielte Modifikationen in bestehenden Systemen erreichen zu können, sind besonders Fragen nach den Prinzipien der Kommunikation zwischen Sensor- und Effektor-Domäne zu beantworten. Dazu müssen Vollängenphotorezeptoren in ausreichender Menge und Qualität zur Verfügung stehen, an denen Signalweiterleitung und Interaktionen zwischen den Domänen untersucht und verstanden werden können. Im optimalen Fall beinhaltet dies die Aufklärung der Röntgenkristallstruktur und zusätzliche Informationen über die Dynamik der lichtinduzierten Strukturänderungen.

Um diesen grundlegenden Ansatz zu verfolgen, wurde eine Studie an bPAC vorgenommen, die funktionelle Details der BLUF-Zyklase und insbesondere ihre Lichtaktivierung betreffen. Dabei wurden auch anwendungsrelevante Aspekte berücksichtigt. Als eine

BLUF-Domänen aktivierbare Adenylatzyklase stellt bPAC ein attraktives Modell dar: Durch ihren einfachen Domänen-Aufbau ist es für Modifikationen leicht zugänglich. Änderungen im Sensorteil können durch Absorptionsspektroskopie im sichtbaren Bereich verfolgt werden. Die enzymatische Aktivität kann unter definierten Bedingungen bestimmt und in einen direkten Zusammenhang mit dem Zustand des Sensorteils gestellt werden.

2.4.1 Zykase-Aktivität erfordert die Anwesenheit der BLUF-Domänen

Um zu klären, welchen Einfluss die BLUF-Domänen auf die intrinsische Aktivität der isolierten Zykase haben, wurde die Aktivität eines N-terminal um die BLUF-Domäne verkürzten Konstruktes (Reste 97-350) untersucht (Abb. 2.27 A). Mit einer spezifischen Aktivität von $30 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ liegt die isolierte Zykase im Bereich der Dunkelaktivität von bPAC (Abbildung 2.27 B). Damit kann die Zykase in Abwesenheit der regulatorischen BLUF-Domäne als inaktiv betrachtet werden.

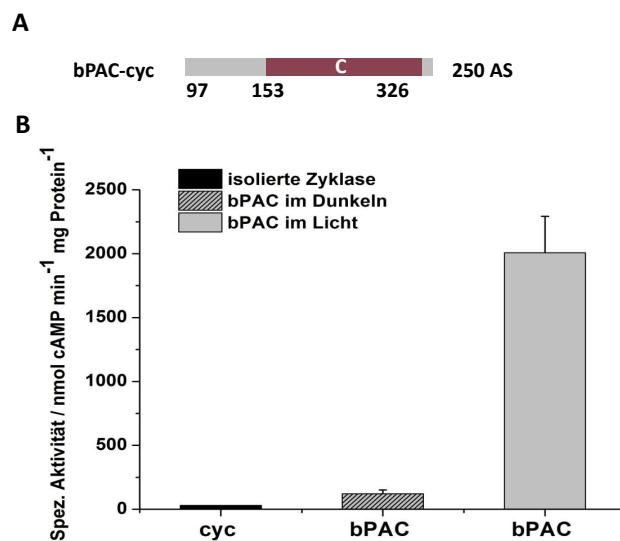


Abbildung 2.27: Verhalten der isolierten Zykase (cyc)

A Konstrukt für die Expression der isolierten Zykase bPAC-cyc. Das Konstrukt umfasst den *Linker* und die Zykase-Domäne von den Resten 97 bis 350. **B** Die spezifische Aktivität der isolierte Zykase (cyc) ist geringer als die Dunkelaktivität von Vollängen-bPAC. Das entspricht einer inaktiven isolierten Zykase.

2.4.2 Einfluss ausgewählter Aminosäurereste auf die Aktivität von bPAC

Photochemische Reaktionen werden durch Absorption von Photonen ausgelöst und sind von Änderungen in der Proteinumgebung des Rezeptorpigmentes begleitet. Die Bedeutung einer Aminosäure für photochemische und nachfolgende regulatorische Prozesse bPACs wurde durch spektroskopische und enzymatische Untersuchungen an mutierten Varianten beurteilt. Basierend auf dem Sequenzvergleich in Abb. 1.13 A wurden insgesamt 6 Reste anhand ihres kinetischen, spektralen und photochemisch relevanten Einflusses in BLUF-Domänen ausgewählt. Diese wurden vor dem Hintergrund funktionaler Aspekte und zwecks Verbesserung der optogenetischen Eigenschaften bPACs mutiert. Ziel der Optimierung waren bPAC-Varianten sowohl mit beschleunigter als auch mit verlangsamter Rückkehrkinetik sowie farbverschobene Varianten mit einer Anregbarkeit im längerwelligen Bereich zu erhalten.

Die resultierenden bPAC-Varianten wurden als SUMO-Fusionskonstrukte aufgereinigt und in ihren photochemischen, sowie enzymatischen Eigenschaften analysiert. Die Bestimmung der Adenylatzyklase-Aktivität erfolgte unter Standardbedingungen bei 3-minütiger Inkubationszeit im Licht und im Dunkeln (siehe Anhang 0.4). Im Folgenden werden bPAC-Varianten nach ihrer Intention zusammengefasst und im Ergebnis vorgestellt.

Varianten mit Einfluss auf die Signaltransduktion und die Kinetik des Signalzustandes

Bereits seit 2005 wird die Frage nach den Aminosäuren, die in BLUF-Domänen entscheidend an der Signalweiterleitung beteiligt sind, kontrovers diskutiert [67, 98, 194, 196]. Erste Studien schrieben dem in BLUF-Domänen semikonservierten Tryptophan (siehe Abbildung 2.28) eine bedeutende Rolle bei der Übermittlung biologischer Signale zu [98]. Später wurde die essentielle Bedeutung des konservierten Methionins postuliert und durch strukturelle Untersuchungen untermauert [100, 196]. Bis heute ist es zu keiner abschließenden Bewertung gekommen.

Neben einer möglichen Schlüsselrolle von Tryptophan im Regulationsprozess beeinflussen Mutationen dieser Aminosäure auch die Geschwindigkeit der Rückkehr in den Grundzustand. Während der Austausch von Tryptophan zu Alanin in allen untersuchten BLUF-Domänen zu einer Beschleunigung der Reaktion führte, so wirkte sich das Einführen eines Tyrosins an dieser Stelle kontrovers aus: in AppA-W104F beschleunigte [78], in Slr1694-W91F verlangsamte es den Photozyklus drastisch [11].

Mit dem Ziel sowohl schnellere als auch verlangsamte Photozyklus-Varianten zu erhalten, wurden bPAC-W91A und bPAC-W91F produziert. Nach dem Vorbild von BlrB, bei

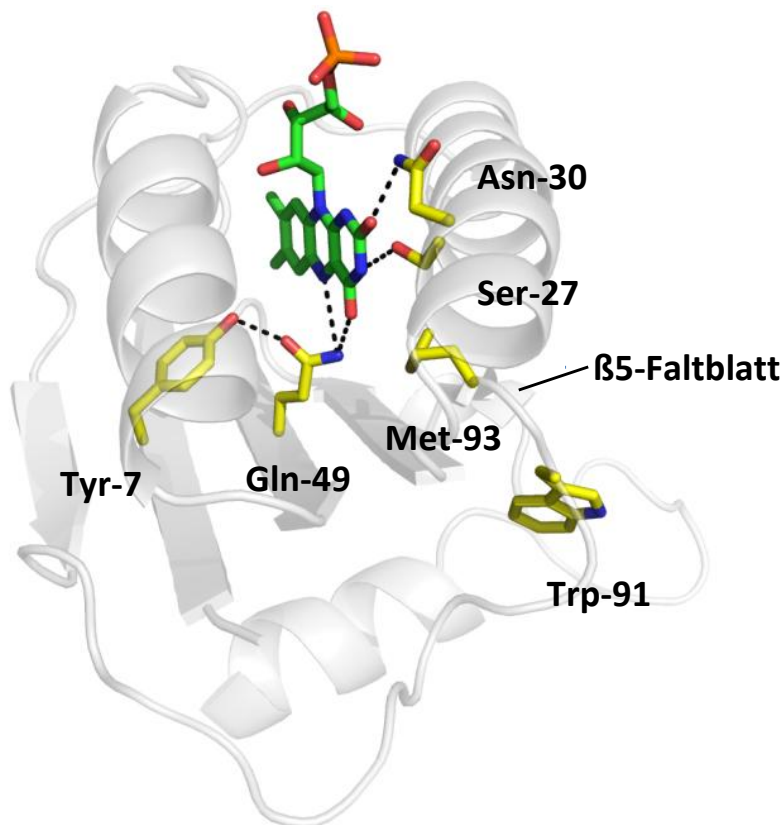


Abbildung 2.28: Berechnete Struktur der bPAC BLUF-Domäne mit interessanten Aminosäuren

Die modellierte Struktur der BLUF-Domäne bPACs wurde auf der Basis der Struktur 1xOp (*Thermococcus elongatus* Tll0078 [73]) berechnet. Verschiedene Aminosäuren, deren Funktion in der BLUF-Photochemie oder der Photoaktivierung diskutiert wird, sind gelb gezeigt. Der Flavinkofaktor (grün) sowie der Bereich des $\beta 5$ -Faltblattes sind hervorgehoben.

dem die Mutation L66F eine Beschleunigung der Kinetik in den Millisekunden-Bereich bewirkt [184], wurde bPAC-L61F geplant. Um darüber hinaus die Frage nach der Bedeutung von Tryptophan und Methionin für die Signalübermittlung zu adressieren, wurde die Gruppe um die Variante bPAC-M93A ergänzt.

Die kinetischen Varianten bPAC-W91A und bPAC-W91F bilden unter Belichtung den rotverschobenen Zustand aus. Licht- und dunkeladaptierte Absorptionsspektren sind in ihrer Lage dem Wildtyp gleich (Tabelle 2.29 A). Abweichend vom Wildtyp weisen sie eine veränderte Dynamik der Dunkelrückkehr auf. Wie in Slr1694 bewirken die Mutationen W91A und W91F eine Verringerung bzw. eine Vergrößerung der Rückkehrkonstante auf 10 s und 120 s. Dies stellt eine 8-fache Verlangsamung gegenüber dem Wildtyp dar und entspricht dem Effekt in Slr1694. Die erzielte Beschleunigung durch W91A fällt mit

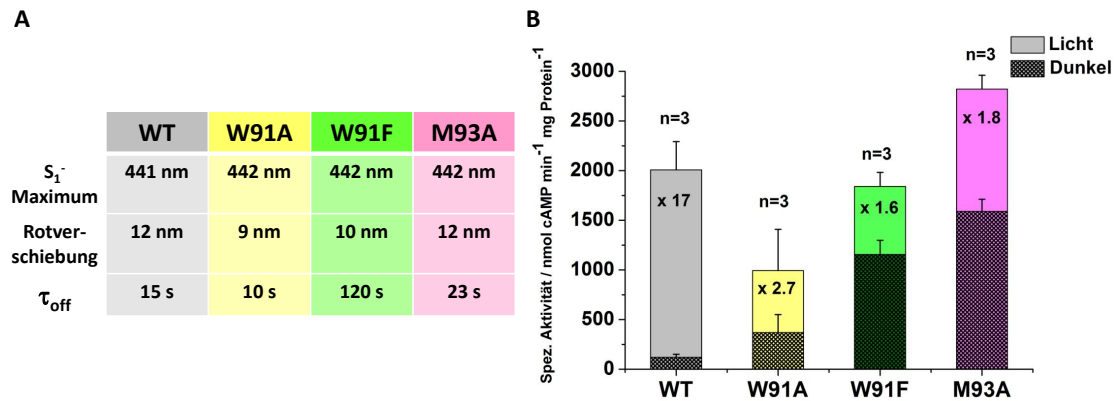


Abbildung 2.29: Photochemische und enzymatische Eigenschaften von bPAC-Varianten mit Wirkung auf die Signaltransduktion

A Tabelle mit Absorptions- und Photozyklus-Parametern sowie **B** spezifische Aktivitäten von bPAC-Wildtyp und den Varianten bPAC-W91A, -W91F und -M93A im Dunkeln und im Licht. Es sind Mittelwerte und Standardabweichung aus einer Dreifachbestimmung angegeben.

einem Faktor von 1.5 jedoch geringer als in Slr1694 (Faktor 15) aus. Neben dem Einfluss auf Rückkehrkinetik haben die Aminosäure-Substitutionen auch einen Effekt auf die enzymatische Aktivität des Enzyms (Abbildung 2.29 B). Beide Varianten besitzen bei reduzierter Lichtaktivität eine vergleichsweise hohe Dunkelaktivität.

Auch die Variante bPAC-M93A unterscheidet sich in kinetischer Hinsicht vom Wildtyp: Sie besitzt eine verlangsamte Rückkehrkinetik (Zeitkonstante $\tau_{off} = 23$ s). Wie beide Tryptophan-Mutationen führt der Austausch M93A zu einer signifikant gesteigerten Aktivität im Dunkeln (Abbildung 2.29 B). Im Licht verbleibt dagegen die Aktivität auf WT-Niveau. Die Variante bPAC-L61F ergab unlösliches Protein und konnte nicht charakterisiert werden.

Varianten mit Einfluss auf die spektrale Lage der Kofaktorabsorption

Gegenüber den meisten bekannten BLUF-Proteinen besitzen nPAC35 und nPAC75 ein natürlicherweise um bis zu 20 nm längerwellig verschobenes Absorptionsspektrum (Kapitel 2.2.2). Anregung im längerwelligeren Spektralbereich ist aufgrund seiner größeren Penetrationsfähigkeit und seiner geringeren Energie vorteilhaft für Zellen und Gewebe. Mit dem Ziel, die dafür verantwortlichen Aminosäuren ausfindig zu machen und einen vergleichbare Rotverschiebung in bPAC zu erzeugen, wurden anhand des *Alignments* 1.13 A zwei Chromophor nahe Reste identifiziert und entsprechend der Besetzung in nPAC35 sowie anderen rotverschobenen BLUF-Domänen substituiert.

2.4 Funktionelle Analyse und anwendungsbezogene Optimierung von bPAC

Die Position des Serin-27 (Abb. 2.28) ist in nPAC35, nPAC75, YcgF und den F2-Domänen von euPAC α und euPAC β durch ein Alanin besetzt. Ein entsprechend in Slr1694 eingeführtes Alanin konnte das Spektrum um 15 nm in den roten Bereich verschieben (M. Stierl, Diplomarbeit). Um einen äquivalenten Rotshift auch in bPAC zu erreichen und die spektrale Bedeutung der Position zu belegen, wurde die Mutation S27A in bPAC eingeführt. Quantenmechanische Berechnungen legen nahe, dass die Einführung polarer Reste an der hydrophilen Seite des Isoalloxazinringes eine Rotverschiebung hervorruft (B. Dick, pers. Kommunikation). Um einen weiteren Beitrag von Chromophornahen Resten an rotverschobenen BLUF-Absorptionsspektren nachzuweisen, wurde das Asparagin-N30 gegen das in nPAC35 und nPAC75 vorhandene Glutamat ausgetauscht (Abb. 2.28).

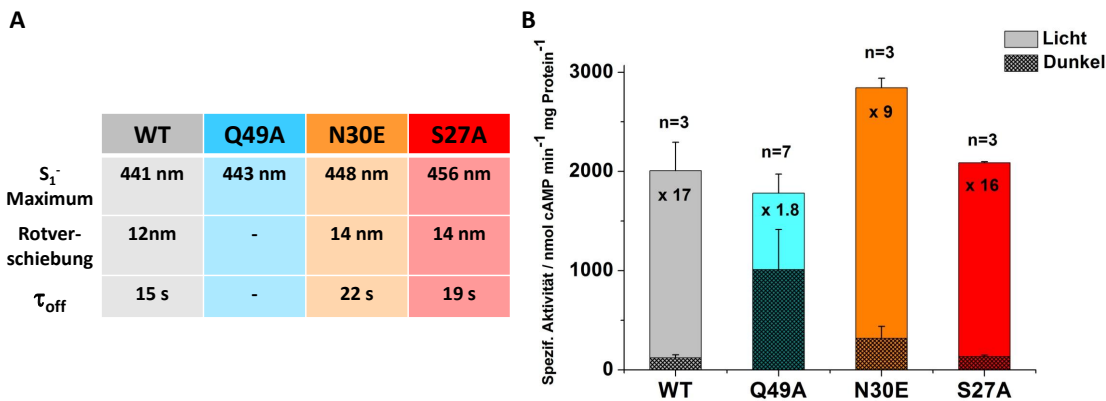


Abbildung 2.30: Photochemische und enzymatische Eigenschaften natürlicher bPAC-Varianten und der Variante bPAC-Q49A

A Tabelle mit Absorptions- und Photozyklus-Parametern sowie **B** spezifische Aktivitäten von bPAC-Wildtyp und den Varianten bPAC-Q49A, -N30E und -S27A im Dunkeln und im Licht. Es sind Mittelwerte und Standardabweichung aus einer Dreifach- bzw. für Q49A Siebenfachbestimmung angegeben.

Die Aktivitäten der beiden Varianten bPAC-S27A und bPAC-N30E besitzen Wildtyp-ähnlichen Charakter; Dunkel- sowie Lichtaktivitäten liegen in derselben Größenordnung. Anders als in den Varianten mit Einfluss auf die Signalweiterleitung, bleibt die Lichtaktivierung des Enzyms nach Substitution erhalten (Abbildung 2.30 B). Die spektroskopischen Daten beider Varianten ergeben einen dem Wildtyp ähnlichen Photozyklus (Tabelle 2.30 A). Durch Einführung der Mutationen gelang es aber, die Lage der Absorptionsspektren von 441 nm um 15 nm (bPAC-S27A) bzw. um 7 nm (bPAC-N30E) zu längeren Wellenlängen hin zu verschieben. Die Charakterisierung der Doppelmutante

2 Ergebnisse

bPAC-S27A-N30E steht noch aus.

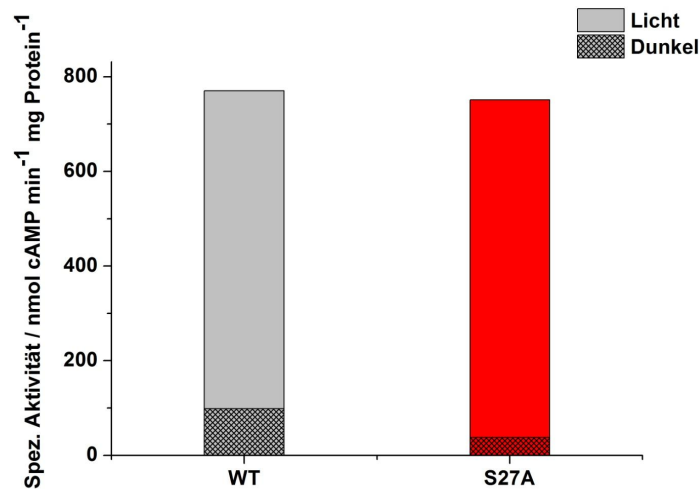


Abbildung 2.31: Vergleich der Dunkelaktivitäten von bPAC-WT und bPAC-S27A bei hoher Proteinkonzentration

Unter Bedingungen mit 5-fach erhöhter Proteinkonzentration ($1 \mu\text{M}$) wird deutlich, dass bPAC-S27A eine niedrigere Dunkelaktivität als der Wildtyp besitzt.

Darüber hinaus wurde in der Variante bPAC-S27A interessanterweise eine im Vergleich zum Wildtyp geringer ausgeprägte Aktivität im Dunkeln festgestellt. Um dies zu vertiefen, wurden Versuche mit fünffach höherer Proteinmenge ausgeführt (Abb. 2.31). Dabei wurde in der Mutante eine auf etwa 40 % reduzierte Dunkelaktivität gefunden. Obwohl die Substitution auch die Lichtaktivität vermindert, wirken sich die Änderungen dennoch günstig auf das Aktivierungs-Verhältnis aus. Unter den angewendeten Bedingungen ergibt sich für bPAC eine 8-fache, für bPAC-S27A sogar eine 20-fache Steigerung der Aktivität im Licht. Aufgrund der geringen Basalaktivität und der verbesserten dynamischen Breite ist diese Variante für optogenetische Anwendungen mit Langzeitexpression besonders geeignet.

Um den Vorteil der Mutante auch *in vivo* zu zeigen, wurde ein Vergleich mit bPAC-WT im Oozyten-Funktionstest vorgenommen. Dafür wurden Oozyten mit PAC und Kanal-RNA in einem 10-fach stärkeren Verhältnis (1:10) injiziert und am 3. Expressionstag die Leitfähigkeit der Zellen im Dunkeln bestimmt, indem kapazitive Pulse angelegt wurden. Die durchschnittliche Dunkelleitfähigkeit in je 6 Zellen lag mit $3.8 \pm 1.9 \mu\text{S}$ (bPAC) und $3.2 \pm 1.6 \mu\text{S}$ (bPAC-S27A) doppelt so hoch wie der Kontrollwert ($1.8 \pm 0.5 \mu\text{S}$), zeigte jedoch im Vergleich keine signifikante Differenz. Der *in vitro* gefundene Unterschied wird vermutlich in der Zelle abgeschwächt oder kompensiert.

Photozyklus-inaktive Varianten und Umkehr der Lichtabhängigkeit in bPAC-Y7F

Nach allgemeiner Auffassung ist der Signalzustand eines Photorezeptors die biologisch aktive Spezies. Ein photochemisch inaktives bPAC, das den Signalzustand nicht mehr ausbilden kann, ist daher mit der Vorstellung eines nicht-funktionalen Enzyms verbunden. Mit dem Ziel, die Bedeutung des Signalzustandes für die enzymatische Aktivität und Regulationsfähigkeit des Enzyms zu untersuchen, wurden zwei zur Ausbildung des rotverschobenen Intermediates essentielle Reste ausgetauscht: das konservierte Glutamin-49 gegen Alanin und das konservierte Tyrosin-7 gegen Phenylalanin (Abbildung 2.28).

Ähnliche oder vergleichbare Mutationen sind in der Literatur nahezu an allen gut untersuchten BLUF-Domänen bekannt: In den BLUF-Domänen von AppA, BlrB, Tl0078 und in anderen Fällen verhindert der Austausch des Glutamins die Bildung des Signalzustandes [73, 174, 184]. Ebenso führen Mutationen des konservierten Tyrosins in allen untersuchten BLUF-Domänen zu Photozyklus-inaktiven Varianten, sowie zu einer leichten Blauverschiebung des Absorptionsspektrums [54, 76, 77, 123].

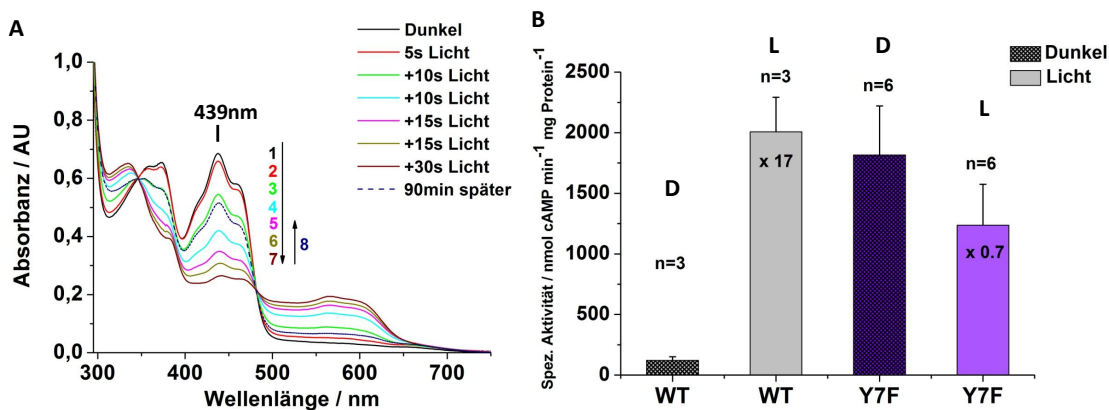


Abbildung 2.32: Radikalbildung und spezifische Aktivität in bPAC-Y7F

A Absorptionsspektren von bPAC-Y7F im Dunkeln (schwarz), nach wiederholter Belichtung (verschiedene Farben) und nach Inkubation im Dunkeln (gestrichelt). Kontinuierliche Beleuchtung führt zur Ausbildung eines neutralen Flavin-Radikals. **B** Spezifische Aktivität von bPAC-Wildtyp und der Variante bPAC-Y7F im Dunkeln und im Licht. Die Mutation Y7F bewirkt eine Umkehr der Lichtabhängigkeit von bPAC. Es sind Mittelwerte und Standardabweichung aus einer Dreifach- (WT) bzw. Sechsfachbestimmung angegeben.

Die spektroskopischen Messungen bestätigen, dass die Variante bPAC-Q49A nach Belichtung kein rotverschobenes Intermediat mehr bildet und Photozyklus-inaktiv ist. In bPAC-Y7F bewirkt die Substitution des Tyrosins durch Phenylalanin eine Veränderung des photochemischen Verhaltens: Anhaltende Belichtung führt nicht zur Bildung des

BLUF-typischen rotverschobenen Intermediates, sondern zu einem Bleichen der S_1 -Absorption und geht mit der Neubildung zweier stark rotverschobener Banden einher (Abbildung 2.32 A). Durch periodisches Beleuchten wird die neue Spezies akkumuliert, die sich durch eine breite Absorptionsbande mit einem Maximum bei 563 nm und einer Schulter bei 598 nm auszeichnet; ihre spektrale Form entspricht der eines neutralen Flavin-Semichinonradikals [95]. Zwei isosbestische Punkte bei 482 nm und 346 nm weisen auf die alleinige Existenz von oxidiertem Flavin und dem Flavin-Neutralradikal in bPAC hin. Die kinetische Analyse zeigt, dass es sich um ein besonders langlebiges Neutralradikal handelt. Die Zeitkonstante der Rückkehr liegt mit $\tau \approx 40$ min im Bereich von Stunden. Um weitere Merkmale der Photochemie und der Photozyklus-Dynamik von bPAC-Y7F zu erhalten, wurde das Absorptionsverhalten der Probe durch Prof. Penzkofer (Universität Regensburg) genauer untersucht. Die Messungen zeigen zwei zusätzliche Besonderheiten auf: Die Absorptionsrückbildung bei 440 nm folgt einer biexponentiellen Kinetik und steht im Gegensatz zu dem einfach exponentiellen Zerfall der Absorption des Neutralradikals bei 590 nm. Daneben erreicht die Absorption bei 440 nm auch nach mehr als 6 Stunden Dunkelpause nur 60 % ihres Ausgangsniveaus. Diese Befunde legen nahe, dass die Bildung des Neutralradikals ein komplexer Vorgang ist, an dem auch irreversible Prozesse beteiligt sind. Eine ausführlichere Beschreibung der durchgeführten Messungen sowie ihre Deutung befindet sich in Anhang 0.3. Legt man eine direkte Bildung des neutralen Semichinonradikals aus dem Dunkelzustand von bPAC-Y7F zu Grunde, so ergibt sich dafür eine Quantenausbeute von $\Phi_{FIH.} = 0.01$. In einem weiteren Versuch wurde das Neutralradikal in seinem Absorptionsmaximum angeregt. Dies führt zu einer deutlichen Zunahme der Streuung der Probe und zeigt so eine Denaturierung oder Aggregatbildung von bPAC-Y7F an.

Sowohl bPAC-Y7F als auch bPAC-Q49A haben im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Dunkelaktivität. Obwohl beide Varianten keinen Signalzustand bilden, reagieren sie mit einer Aktivitätsänderung auf Licht. Während bPAC-Q49A durch Licht geringfügig aktiviert wird (Abb. 2.30 B), vermindert Licht in der Variante bPAC-Y7F die Aktivität und bewirkt somit eine Umkehr der Lichtabhängigkeit (Abb. 2.32 B). Um zu prüfen, ob die Fähigkeit zur Radikalbildung eine intrinsische Fähigkeit der BLUF-Domäne ist oder die Präsenz der Zykase-Domäne erfordert, wurde auch die isolierte BLUF-Y7F-Domäne untersucht. Die Messungen ergeben, dass die Radikalbildung unabhängig vom Konstrukt in der BLUF-Domäne und im Vollängen-Konstrukt stattfindet.

Um auf der Grundlage lichtinduzierter Strukturänderungen das unerwartete Verhalten besonders der radikalbildenden bPAC-Variante beurteilen zu können, sind weitere Untersuchungen an bPAC-Y7F und dessen BLUF-Domäne geplant.

3 Diskussion

3.1 Bewertung der Anwendungscharakteristika kleiner PACs

Ein optimales cAMP-manipulierendes Werkzeug wäre eine PAC, die man wie einen molekularen Lichtschalter beliebig und ohne Zeitverzug an- und ausschalten kann. Idealerweise besäße die PAC im inaktiven Zustand keine, im aktivierten Zustand eine möglichst große und einstellbare Aktivität. Aus thermodynamischer Sicht kann man sich die Funktion von Photorezeptoren durch das Verschieben des Gleichgewichts zwischen einem weniger aktiven und einem stärker aktiven Rezeptorzustand vorstellen. Während im Dunkeln das Gleichgewicht zu Gunsten des weniger aktiven Zustandes verschoben ist, bewirkt Licht eine Zunahme der aktiven Population. Tatsächlich sind Photorezeptoren häufig bereits im inaktiven Zustand mit einer Basalaktivität behaftet, die in einem charakteristischen Verhältnis zur Lichtaktivität steht. Die zyklische Natur ihrer photochemischen Abläufe definiert die Kinetik von Enzymaktivierung und -inaktivierung. Die Zeitkonstanten dieser Prozesse bestimmen die Schaltgeschwindigkeit, die Enzymaktivität und die Größe der Lichteffekte in optogenetischen Anwendungen. Dunkelaktivität zwingt die Zelle zur Adaptation an ein chronisch erhöhtes cAMP-Niveau. Potenzielle Werkzeuge müssen an diesen Aspekten gemessen werden.

Mit den kleinen BLUF-Zyklasen bPAC, nPAC76, nPAC35 und nPAC75 wurden vier neue Kandidaten für die optische Kontrolle zytosolischer cAMP-Spiegel gefunden und zunächst deren Funktion als lichtaktivierbare Adenylatzyklasten in *E. coli*, in *Xenopus*-Oozyten und in Säugerzellen indirekt nachgewiesen. Um ausreichende Mengen an rekombinantem Protein herzustellen, wurde die geringe Löslichkeit der Proteine in *E. coli* sukzessive unter Verwendung verschiedener Promotersysteme, in Verbindung mit dem SUMO-Fusionsprotein und später durch die Verwendung des Chaperon-koexprimierenden Stammes verbessert. Die Reinigungen erbrachten zwischen 1 und 20 mg lösliches, nahezu reines Protein (> 80%) aus 3 Litern Kultur. Die Experimente mit präpariertem Protein und die Ergebnisse der Funktionsassays zeigen, dass die vier PACs unterschiedliche photochemische und enzymatische Eigenschaften aufweisen. Diese Eigenschaften spiegeln sich im Verlauf und in der Stärke der lichtinduzierten Effekte wider. Tabelle 3.1 fasst die wichtigsten Ergebnisse zusammen.

	nPAC35	nPAC76	nPAC75	bPAC
Aktivität <i>in vitro</i> [nmol cAMP/mg·min] im Dunkeln/ im Licht, Faktor der Aktivierung	1.1/23 20	3.9/313 80	2.2/348 160	12/2922 240
Dunkelrelaxation τ_{off}	4 min	10 s	2 min	15 s
Aktivität in <i>E. coli</i> auf MacConkey-Agar	++	-	+	++
Aktivität im Oozyten-Assay, Verhältnis PAC:CNG-RNA, Zeit zum max. Strom/ Effektdauer	n.d. 1:5 n.d.	+ 1:5 10 s/ ca. 50 s	n.d. 1:15 n.d.	++ 1:92 50 s/ ca. 6 min
Aktivität in CHO-Zellen, Belichtungsdauer	+ 20 min	+ 2 min	+ 20 min	++ 10 s

Abbildung 3.1: Vergleich der Aktivitäten kleiner PACs *in vitro* und *in vivo*
Die Tabelle fasst die Ergebnisse der zellfreien und zellbasierten Aktivitätsbestimmung kleiner PACs zusammen. Angegeben sind spezifische Dunkel- und Lichtaktivität, der Faktor der Lichtaktivierung, die Zeitkonstante der Dunkelrelaxation und die Aktivitäten in den Funktionsassays unter den entsprechenden Bedingungen. n.d.: nicht detektiert.

Die Resultate zeigen, dass die Aktivitäten *in vitro* nicht direkt mit den Aktivitäten in den Funktionstests korreliert werden können. nPAC35, die eine 20-fache Steigerung der Zyklase-Aktivität bei allgemein geringem Substratumsatz kennzeichnet, zeigt Zyklase-Aktivität im bakteriellen Test, führt aber in Verbindung mit CNG-Kanälen nur zu einer schwachen Aktivierung. Vergleichbare Resultate in den Funktionstests wurden auch für nPAC75 erhalten, für die sich *in vitro* bei einer größeren spezifischen Lichtaktivität eine deutliche Steigerungsrate von 160 ergibt. nPAC76 besitzt eine zu nPAC75 ähnliche Lichtaktivität und zeigt eine 80-fache Zyklaseaktivierung im Licht. In den Anwendungen erzielt es ausgeprägte CNG-vermittelte Effekte, bewirkt aber keine Initiierung der cAMP-abhängigen Transkription in *E. coli*. Allgemein besitzen alle drei nPACs eine vergleichsweise geringe cAMP-manipulierende Wirkung. Zum Nachweis ihrer lichtinduzierten Aktivität erfordern sie eine starke Proteinexpression bzw. eine intensive Anregung. Besonders der fehlende Nachweis der Aktivität von nPAC76 auf MacConkey-Agar ist unerwartet und lässt sich aus den an nPAC76 bestimmten Enzymeigenschaften (Licht- und Dunkelaktivität) nicht erklären. Ebenso unklar bleibt, warum nPAC75 mit guter Lichtaktivierbarkeit in den *in vivo*-Tests nur mittelmäßige Ergebnisse erzielt. Ausschlaggebend für die effektive Aktivität sind über die gemessenen Enzymeigenschaften hinaus auch photochemische und photodynamische Rezeptoreigenschaften, die unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen das photodynamische Gleichgewicht bestimmen. Dazu

3.1 Bewertung der Anwendungscharakteristika kleiner PACs

zählen neben den unterschiedlichen Relaxationszeiten der vier PACs auch die Quantenausbeute des Signalzustandes und die Intensität des Anregungslichtes. Da die zellbasierten Tests das cAMP-Level nur indirekt anzeigen, wird in den *in vivo* Aktivitäten der Einfluss weiterer Faktoren deutlich. So wirkt sich auch die räumliche Distanz zwischen dem Bildungs- und Wirkungsort, die Proteinlöslichkeit oder die Aktivität endogener Phosphodiesterasen auf die scheinbare Aktivität aus. Sich daraus ergebende Unterschiede können auch für potenzielle Anwendungen von Interesse sein.

Die Aktivität von bPAC wurde ebenso von Ryu und Kollegen auf MacConkey-Agar untersucht [142]. Die Ergebnisse decken sich, indem sie die Fähigkeit bPACs zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Genregulation in *E. coli* belegen. Darüber hinaus gelang Ryu der Nachweis der Lichtaktivierbarkeit bPACs. Bezüglich den verwendeten Materialien unterscheiden sich die Assays in mehreren Punkten: Während wir für den Assay einen BTH-Stamm in Kombination mit einem T7-induzierbaren Expressionsplasmid und einem Pepton-haltigem MacConkey-Medium nutzten, führten Ryu und Kollegen den Assay mit einem Zyklase-defizienten BL21(DE3) Stamm unter Verwendung eines Arabinose-induzierbaren Promoter-Systems auf Minimalmedium durch. Einerseits unterstützt wahrscheinlich die über einen breiteren Bereich einstellbare Regulierbarkeit des *Ara*-Promoters die Umsetzung des geeigneten Expressionslevels. Da aber die Verwendung von Minimalmedium das Wachstum von *E. coli* unter cAMP-Mangel vollständig verhindert, trägt andererseits auch diese stärkere Selektion zur verbesserten Differenzierung der Licht- und Dunkelaktivitäten bei.

Von den vier PACs zeigt nur bPAC auf MacConkey-Agar in *E. coli* und in Verbindung mit CNG-Kanälen in *Xenopus*-Oozyten und *CHO*-Zellen signifikante Aktivität und besitzt somit das größte Anwendungspotenzial. bPAC ist mit einer Lichtaktivität von $2922 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ und einer 240-fachen Lichtaktivierung die Zyklase mit dem besten Licht-zu-Dunkelaktivitätsverhältnis (Tab. 3.1); demzufolge erzielt es auch bei geringer Expression große Effekte. Die Stärke der Lichteffekte kann durch Abschwächen der Lichtintensität reduziert oder deren Dauer durch Mehrfachanregung ausgedehnt werden (Abb. 2.3). Vorteilhaft ist außerdem die vergleichsweise kurze Photozyklus-Dauer von ca. 15 s. Die weitere Diskussion von bPAC wird in den folgenden Abschnitten vorgenommen.

Die drei nPACs sind funktionelle, photoaktivierbare Adenylatzyklasten, die alle aus demselben Organismus stammen und trotz vergleichsweise geringer Zyklaseaktivität für die Erforschung der *Naegleria*-Physiologie von großem Interesse sind. Dabei stellt sich speziell die Frage, welche Bedeutung das Vorkommen mehrerer unterschiedlich aktiver BLUF-Zyklasten für den Organismus hat, und in welchem Zusammenhang die Genaktivität der

PACs mit den verschiedenen Lebensstadien steht. *Naegleria gruberi* ist ein weit verbreiteter, mikrobieller Eukaryot, dessen Genom im Jahr 2010 vollständig entschlüsselt werden konnte [30]. Die Genomanalyse zeigt die Kapazität *Naeglerias* für einen vielseitigen Metabolismus und zahlreiche Signaltransduktionskaskaden auf. *Naegleria* besitzen mindestens 108 Gene für Adenylat- oder Guanylatzyklasen, davon etwa 21 lösliche Isoformen. Etwa die Hälfte der Zyklen kommen in Verbindung mit PAS-Domänen vor; vier davon sind photoaktivierbare Adenylatzyklen. Die physiologische Bedeutung von photoaktivierten Adenylatzyklen ist bislang ausschließlich in einer Gruppe *Euglenoiden* untersucht; speziell in *Euglena gracilis* wurde PAC-vermittelte Phototaxis und photophobe Reaktionen nachgewiesen [120]. Die Tatsache, dass *Euglenoiden* wie phasenweise auch *Naegleria* Flagellen besitzen, und darüber hinaus in dem Flagellaten *Chlamydomonas* ein Zusammenhang zwischen intrazellulärem cAMP und der Flagellenmotilität hergestellt werden konnte [51], lässt einen physiologischen Bezug zur lichtgesteuerten Flagellenbewegung in *Naegleria* vermuten. Ein weiterer Aspekt mit möglicher physiologischer Relevanz für *Naegleria* ist der nachweisliche Einfluss von cAMP auf die Differenzierung von parasitären Protisten und den Transformationsprozess ihrer Lebensstadien [6, 72].

Hinsichtlich einer möglichen physiologischen Funktion von bPAC in *Beggiatoa* besteht Zweideutigkeit in der Literatur: Die großen, filamentartigen, farblosen Schwefelbakterien kommen weltweit vor und sind in der Lage, Sauerstoff oder intern gespeichertes Nitrat als Elektronenakzeptor für die Sulfid-Oxidation zu nutzen [106]. *Beggiatoas* Habitat, die Sulfid- und Sauerstoffreichen Grenzschichten an Gewässergründen, sind dynamische Übergangszonen, deren Lage sich in täglich wiederkehrenden und vom Tageslicht abhängigen Rhythmen verändert. Um diesen zu folgen, führt *Beggiatoa* vertikale, gleitende Bewegungen aus. In einigen *Beggiatoa*-Arten konnte tatsächlich eine photophobe Lichtreaktion nachgewiesen werden [111]. Das Aktionsspektrum legt ein Pigment mit Absorption im Blauen (450 nm) nahe. Damit käme bPAC als Photorezeptor in Frage; weitere Photorezeptoren aus *Beggiatoa* sind in der Literatur bislang nicht beschrieben. Andererseits zeigen Messungen an anderen *Beggiatoa*-Arten keine lichtabhängigen Bewegungen [57]. Vielmehr scheint Licht die Verteilung *Beggiatoas* nur indirekt zu beeinflussen, da Licht dieser Wellenlänge nicht in tiefere Schichten der bis zu 10 mm dicken Baktermatten vordringen kann.

3.2 Bewertung der Enzymeigenschaften von bPAC *in vitro*

Durch die detaillierte Charakterisierung der bPAC-Aktivität im azellulären Kontext soll ihre biotechnologische Anwendbarkeit untermauert werden. Tabelle 3.2 vergleicht *in vi-*

3.2 Bewertung der Enzymeigenschaften von bPAC *in vitro*

tro bestimmte Enzymparameter bPACs mit denen von euPAC und den durch Ryu erhaltenen Werten an bPAC. Im Vergleich zu isoliertem euPAC [60, 193] aus *Euglena gracilis* weist bPAC die deutlich höhere Zyklaseaktivität auf. Dabei übersteigen die in dieser Arbeit bestimmten spezifischen bPAC-Aktivitäten auch die von uns veröffentlichten deutlich (im Dunkeln: 0.033 vs. 12.2 nmol cAMP·min⁻¹·mg⁻¹ und im Licht: 10 vs. 2922 nmol cAMP·min⁻¹·mg⁻¹) und sind ursächlich auf verbesserte Präparations- und *in vitro*-Testbedingungen zurückzuführen. Die Aktivität von bPAC ist damit im oberen Bereich anderer mikrobieller Adenylatzyklen anzusiedeln [152, 164].

	euPAC (Iseki)	bPAC (Stierl)	bPAC (Ryu)
Lichtsättigung der Aktivität	> 2.8 $\mu\text{W}\cdot\text{mm}^{-2}$ (> 11 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 450nm)	10 $\mu\text{W}\cdot\text{mm}^{-2}$ (*)	> 10 $\mu\text{W}\cdot\text{mm}^{-2}$
Steigerung der Aktivität im Licht	80	> 100	> 100
Inaktivierung der Aktivität nach Licht	< 0.1 s	23 s (*)	> 60 min
Substrat-Abhängigkeit	Michaelis-Menten	Inhibierung ab 2 mM ATP	Michaelis-Menten
ATP-Sättigung	50 μM	1 mM	2 mM
Maximalgeschwindigkeit v_{max}	3.5 $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$	4400 $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$	57 $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$
Substrat-Affinität K_{M} bzw. SC_{50}	0.5 μM	0.3 mM	0.5 mM
Assay-Bedingungen	100 μM ATP, [PAC] k.A., pH 7.5, 1 mM Mn^{2+} , 2.8 $\mu\text{W}\cdot\text{mm}^{-2}$	100 μM ATP, 0.2 μM SUMO-bPAC, pH 8, 2 mM Mg^{2+} , 1.7 $\text{mW}\cdot\text{mm}^{-2}$	1 mM ATP, 5 μM MBP-bPAC, pH 8, 10 mM Mg^{2+} , 10 $\mu\text{W}\cdot\text{mm}^{-2}$

Abbildung 3.2: Enzymatische Eigenschaften von euPAC und bPAC

Die Tabelle vergleicht Enzymeigenschaften von euPAC und bPAC aus *in vitro* Analysen. Die aufgeführten Werte sind für euPAC den Arbeiten von Iseki *et al.* [60] und Yoshikawa *et al.* [193] und für bPAC den Arbeiten Ryu *et al.* [142] und der vorliegenden Arbeit entnommen. (*) Diese Werte wurden abweichend unter den Bedingungen 100 μM ATP, 10 μg bPAC in 24 μl , pH 7.4, 1 mM Mg^{2+} , 300 mM KCl, 50 mM Tris-Hepes bestimmt [156]. k.A.: keine Angabe.

Maximaler Substratumsatz wird bei ATP-Konzentrationen um 1 mM erreicht. Unter physiologischen ATP-Bedingungen (10 mM) ist die Aktivität bPACs geringer. Dies ist konsistent mit der Funktion einer zytosolischen Zyklase, die speziell bei Absinken der ATP-Konzentration unter einen Schwellenwert (4-5 mM) aktiv wird, um energieliefernde Reaktionen zu aktivieren.

Neben primären Beurteilungskriterien wie einer großen Lichtaktivität (1-4 μmol cAMP·min⁻¹·mg⁻¹) und der bis zu 240-fachen Lichtaktivierung zeigt bPAC stabile Enzymaktivität unter kontinuierlicher Belichtung. Ihre Aktivität ist tolerant gegenüber Temperaturen bis zu 50 °C und kompatibel mit pH-Werten zwischen 7 und 9.5 (Abb. 2.21 B und

Abb. 2.22 A und B). Die Verbindung eines Lichtsättigungswertes von $4 \mu\text{W}\cdot\text{mm}^{-2}$ mit einer hohen Aktivität im Licht macht bPAC zu einer PAC mit hoher Lichtempfindlichkeit. Damit weist bPAC vorteilhafte Eigenschaften für Anwendungsfelder wie z.B. nicht transparente Tiere auf, die für hohe Lichtintensitäten experimentell schwer zugänglich sind.

Neben der Lichtsättigung und der großen Lichtaktivität trägt auch die nach Aktivierung 23 s lang anhaltende Zykklase-Aktivität zu einer hohen Ausnutzung von Licht bei (Abb. 2.21 A). Dieser meist positive Effekt sorgt nach Lichtaktivierung für hohe, lang anhaltende cAMP-Level, begrenzt jedoch in gleicher Weise zeitliche Modulationsmöglichkeiten. Die Korrelation zwischen der Abklingdauer der Zykklaseaktivität (23 s) und der Lebensdauer des rotverschobenen Intermediates (15 s) legt den Schluss nahe, dass der rotverschobene Zustand der Signalzustand und damit der enzymatisch aktive Zustand von bPAC ist. Dies entspricht der Vorstellung des biologisch aktiven Signalzustandes in BLUF-Domänen [97].

Die durch Ryu *et al.* [142] und die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Charakterisierung bPACs ergeben ein einheitliches Bild ihrer enzymatischen Eigenschaften. Deutliche Abweichungen treten außer in der Höhe der spezifischen Aktivität, auch bei der Inaktivierungsdauer nach Anregung und beim Substrat-Sättigungsverhalten auf. Diese Unterschiede sind vermutlich teilweise auf den Einfluss des jeweiligen Fusionsproteins (Ryu: Maltose-Bindeprotein-bPAC vs. Stierl: SUMO-bPAC) und teilweise auf andere Testbedingungen zurückzuführen. Unter unseren Bedingungen ist das molekulare Verhältnis Substrat zu bPAC etwa 25-mal größer als bei Ryu. Dies könnte die für SUMO-bPAC gefundene Inhibierung der Aktivität oberhalb 2 mM ATP bedingen. Eine vergleichbare Inhibierung wurde durch Ryu ausschließlich in der bPAC-Variante mit vorherrschender Guanylatzyklase-Aktivität (BlgC) gefunden. Auch in diesem Fall ist die Ursache der Hemmung unklar, eine Produkt-Inhibierung bPACs kann anhand der entstandenen cAMP-Mengen ausgeschlossen werden.

3.3 Gegenüberstellung der Anwendungsmerkmale von bPAC und euPAC α

Der anwendungsbezogene Vergleich von bPAC und euPAC α in *Xenopus*-Oozyten, Ratten-Neuronen und *Drosophila*-Fliegen ermöglicht die direkte Gegenüberstellung der Wirkung beider PACs als zellmanipulierende Werkzeuge (Tab 3.3). bPAC stellt gegenüber euPAC α in wichtigen Aspekten eine Verbesserung dar. Dazu zählen insbesondere die geringere Dunkelaktivität und ihre hohe Produktivität im Licht. Die daraus resultie-

3.3 Gegenüberstellung der Anwendungsmerkmale von bPAC und euPAC α

rende dynamische Breite bPACs ist gerade im zellulären Kontext groß und ermöglicht den Einsatz von bPAC auch unter schwachen Lichtverhältnissen. Alternativ erlaubt die große dynamische Breite auch die Dunkelaktivität beispielsweise für Langzeitexperimente durch Regulation der Expressionsstärke weiter zu reduzieren.

Die Charakteristika der lichtinduzierten Effekte sind nicht nur durch die Enzymeigenschaften, sondern auch durch die spezifische Zellumgebung maßgeblich gekennzeichnet. bPAC vermittelt aufgrund ihrer langsameren Inaktivierung und ihres großen Substratumsatzes länger anhaltende Antworten als euPAC α [145]. Dies macht sich in neuronalen Zellen mit ausgeprägter PDE-Aktivität weniger stark bemerkbar, als in Oozyten, wo ein großes Zelllumen und geringe PDE-Aktivität den cAMP-Abbau zeitlich verzögern. Neuronen stellen daher durch ihre effektive Regulierung des cAMP-Spiegels die optimale Umgebung für eine gute zeitliche Korrelation des Signals dar.

PAC-vermittelte Effekte	euPAC α	bPAC
cAMP-Steigerung in <i>Xenopus</i> -Oozyten im Dunkeln / im Licht (*)	20 / 10	1.8 / 100
Lichtinduzierte CNG-Ströme in <i>Xenopus</i> -Oozyten	Aktivierung < 0.2 s, Abklingdauer ca. 4 s	Aktivierung < 0.5 s, Abklingdauer ca. 5 min
Lichtinduzierte CNG-Ströme in Ratten-Neuronen, Relativer Ladungstransfer pro Lichtdosis	Zeit zum max. Strom ca. 0.25 s, Abklingdauer ca. 2 s 1	Zeit zum max. Strom 0.75 s, Abklingdauer ca. 19 s, 8
cAMP-Steigerung im <i>Drosophila</i> -ZNS unter IBMX im Dunkeln / im Licht (*)	ca. 3 / 2.8	ca. 1.2 / 5.8
Lichtinduzierte Verhaltensänderungen in <i>Drosophila</i> -Fliegen	Aktivierung nach ca. 12 s, Abklingdauer ca. 5 s	Aktivierung nach ca. 4 s, Abklingdauer ca. 35 s

Abbildung 3.3: Gegenüberstellung von euPAC α - und bPAC-vermittelten Effekten in Gastsystemen

Die Tabelle vergleicht die unter Anwendung von euPAC α und bPAC in Kapitel 2.3 erzielten Effekte hinsichtlich ihrer relativen Größe und ihres Zeitverlaufes. (*) cAMP-Steigerungen im Dunkeln sind auf die Kontrolle bezogen; cAMP-Steigerungen im Licht sind in Relation zum Dunkelwert angegeben.

Die Befunde bezüglich des Beginns der lichtinduzierten Effekte weichen in den verschiedenen Zellsystemen voneinander ab. Während in CNG-basierten Funktionstests bPAC-vermittelte Effekte gegenüber euPAC α verzögert eintreten, setzen diese in *Drosophila* schneller ein. Die Enzymaktivierung von euPAC α wurde anhand von CNG-Strömen in Oozyten auf kleiner 20 ms geschätzt [145]. Für die Beurteilung spielt neben der Enzymaktivierung jedoch auch die räumliche Distanz zwischen PAC und dem cAMP-Effektor eine Rolle. Da CNG-Kanäle die cAMP-Konzentration in Kompartimenten nahe der Mem-

bran registrieren, kann die Zeitverzögerung bPAC-vermittelter Effekte diffusionsbedingt sein und aus einer unterschiedlichen Lokalisierung der PACs (Zytosol vs. Membran-assoziiert) resultieren.

3.4 bPAC im Vergleich mit optogenetischen Werkzeugen und cAMP-Stimulatoren

Misst man bPAC an den allgemein wünschenswerten Anforderungen eines optogenetischen Werkzeuges, so besitzt bPAC die Vorteile der genetischen Kodierbarkeit, der natürlichen Kofaktorverfügbarkeit und -stabilität, eines einfachen Aufbaus und einer kleinen Größe. Es kann nahezu unbegrenzt wiederholt und zeitlich definiert geschaltet werden. Dabei erfolgt die Photoaktivierung im Subsekundenbereich und verläuft ähnlich schnell wie die anderer Flavin-basierter Werkzeuge [70, 185]. Die Inaktivierung ist jedoch zumindest im Vergleich mit vielen Kanalrhodopsinen (5 ms bis 100 ms) und OptoXRs (Subsekundenbereich) sowie mit euPAC α vergleichsweise langsam, und limitiert die Genauigkeit der Stimulation. In bestimmten Kanalrhodopsin-2 Varianten besteht zudem die Möglichkeit zur lichtinduzierten und Wellenlängen-spezifischen Inaktivierung: Durch Anregung mit grünem Licht kann hier eine Überführung des leitenden Zustandes in den Grundzustand und damit die unmittelbare Kanalschließung induziert werden. In BLUF-Photorezeptoren existiert die Option zur photoinduzierten Rückreaktion nicht [102, 167]. Eine auf definierte Zellbereiche beschränkte cAMP-Kontrolle wurde durch bPAC bislang nicht getestet und ist aufgrund der diffusiblen Natur von cAMP vermutlich nur eingeschränkt möglich.

Besonders wichtig für die erfolgreiche Anwendung eines lichtregulierten Enzyms ist die *in vivo* erzielbare dynamische Breite. Typische Licht-zu-Dunkelverhältnisse isolierter, Flavin-basierter Photorezeptoren liegen im Bereich bis 10:1 [5, 103, 185]. Die für bPAC gefundene 240-fache Aktivierung in Verbindung mit ihrer geringen Dunkelaktivität qualifizieren sie als lichtsensitives, effektives Werkzeug. Eine 1000-fache und damit erheblich größere Aktivitätssteigerung im Licht besitzt lediglich die LOV-regulierte Histidin-Kinase YF1 [109]. Aufgrund fehlender Zielproteine ist sie in Eukaryoten jedoch nicht nutzbar. Besonders geringe Lichtintensitäten ($< 1 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$) erfordert daneben auch das natürliche G α s-gekoppelte Opsin aus der Qualle *Carybdea rastonii* (JellyOP). Seine Fähigkeit zur repetitiven und zeitlich steuerbaren Manipulation von cAMP-Konzentrationen wurde in Säugerzellen demonstriert [4]. Die effiziente Lichtwahrnehmung geht größtenteils auf die Absorptionseigenschaften des Retinals zurück, dessen Extinktions-

3.4 bPAC im Vergleich mit optogenetischen Werkzeugen und cAMP-Stimulatoren

koeffizient mit ca. $60000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) deutlich größer als der von Flavin ($12000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ist. Die in HEK293-Zellen erzielten Anstiege erreichten im Verlauf von wenigen Minuten einen Maximalwert von $7 \mu\text{M}$ cAMP und gingen im gleichen Zeitbereich wieder zurück. Ob dieser Ansatz auch zur Ansteuerung cAMP-abhängiger Signalwege in anderen Zellsystemen geeignet ist, bleibt zu zeigen. Aufgrund seiner Membranständigkeit kommt JellyOP, wie auch andere GPCRs, speziell zur Kontrolle von cAMP in membranassoziierten Kompartimenten in Frage. Im Unterschied dazu wird mit bPAC primär das zytosolische cAMP-Level kontrolliert.

Neben dem klassisch-pharmakologischen und dem optogenetischen Ansatz (siehe auch Tab. 3.4) führten Sample und Kollegen eine Methode zur Manipulation von cAMP in verschiedenen Kompartimenten unter Verwendung einer Bicarbonat aktivierbaren Adenylatzyklase (SMICUS, *spatiotemporal manipulation of intracellular cAMP using sAC*) ein [144]. Um subzelluläre Lokalisation im Zytosol, in den Kern und in die Plasmamembran zu erreichen, wurde die verkürzte katalytische Einheit der löslichen AC aus der Ratte mit Targetsequenzen versehen. Unter Bicarbonat-Zugabe erzeugten diese dosierbare Anstiege der lokalen cAMP-Spiegel, die nach Pufferwechsel komplett reversibel waren. Die cAMP-Steigerungen bemaßen sich in einer 30 % igen Änderung des Emissionsverhältnisses zwischen dem Donor und Akzeptor des FRET-basierten cAMP-Indikators und waren ausreichend, um die cAMP-abhängige PKA zu aktivieren. Aktivierung und Inaktivierung erfolgen im Bereich von Sekunden bis Minuten und zeigen die begrenzte zeitliche Schaltbarkeit auch dieses Systems. Vorteilhaft ist die subzelluläre cAMP-Kontrolle, die sich prinzipiell auch auf den optogenetischen Ansatz übertragen lässt .

Allgemein lassen sich Methoden zur Manipulation von intrazellulärem cAMP in genetisch codierbare und chemisch/ pharmakologische Verfahren einteilen (Tabelle 3.4). Gegenüber den genetisch codierbaren Verfahren (Optogenetik, SMICUS) beruhen chemischen Verfahren zur transienten Erhöhung von cAMP auf der exogenen Zugabe von teilweise kostenintensiven Agenzien. Ihre Anwendung ist aus Gründen der Applizierbarkeit und mangelnder Spezifität auf Zellkulturen/ Schnittkulturen beschränkt und kann nur durch erneute Agenzienzugabe wiederholt werden. Aufgrund der initial erforderlichen Membranpenetration erfolgt der zeitliche Anstieg von cAMP einschleichend über mehrere Minuten und ist damit langsam. Allein beim cAMP-*Uncaging* wird die Freisetzung von cAMP durch UV-Licht ausgelöst und ermöglicht dadurch eine Bereitstellung innerhalb von μs bis ms ohne Zellspezifität. Der Einsatz fokussierter Lichtquellen erlaubt in diesem Fall zusätzlich, cAMP-Spiegel auch lokal begrenzt zu erhöhen. Nachteile der genannten Verfahren sind die begrenzte Stabilität der Agenzien sowie insbesondere die

	Genetisch codierbare cAMP-Kontrolle			Chemisch/ pharmakologische cAMP-Kontrolle		
	bPAC	JellyOP	SMICUS	chemische Agenzien	cAMP <i>Uncaging</i>	cAMP Analoga
Stimulation	mit Licht (450nm)	mit Licht (500nm)	durch NaHCO ₃ -Zugabe	durch Zugabe von Forskolin, IBMX	mit Licht (355 nm)	durch Zugabe z.B. 8 Br-cAMP
Zeitbereich des cAMP-Anstiegs	ms bis s	s bis min	s bis min	min	µs bis ms	s bis min
Wiederholbarkeit	reversibel stimulierbar	reversibel stimulierbar	reversible stimulierbar	erneute, exogene Zugabe	erneute, exogene Zugabe	erneute, exogene Zugabe
Nebeneffekte	(*)	(*)	keine Angabe	z.T. irreversible Effekte	Photolyse-Nebenprodukte	z.T. zelltoxisch
Stabilität	stabil	stabil	stabil	stabil	begrenzt	begrenzt
Zellspezifität	spezifisch	spezifisch	spezifisch	unspezifisch	unspezifisch	unspezifisch
Zelluläre Lokalisation	zytosolisch	membranständig	subzelluläres Targeting	uniform	uniform, lokale Anregung	uniform
Anwendungsfeld	Zellkulturen, lebende Tiere	Zellkulturen, lebende Tiere	Zellkulturen	Zellkulturen	Zellkulturen	Zellkulturen
Zusätze	-	Kofaktorgabe	-	-	-	-
Preis	-	-	-	100 € je 5mg	200 € je 5mg	26- 200 € je 5 mg

Abbildung 3.4: Anwendungsmerkmale von bPAC und anderen cAMP-Stimulatoren

Die Tabelle vergleicht die Eigenschaften genetisch codierbarer Werkzeuge (bPAC, JellyOP [4] und SMICUS [144]) und chemischer Agenzien (Forskolin/IBMX, cAMP *Uncaging*, cAMP Analoga) zur cAMP-Kontrolle. Die chemischen Agenzien sind allgemein membrangängige Substanzen. (*) bei starker Überexpression können Effekte aufgrund von Dunkelaktivität auftreten.

teilweise toxische Wirkung, die sie selbst oder die im UV-Licht entstehenden Nebenprodukte besitzen.

Im Vergleich zur chemischen Manipulation von cAMP zeichnen sich die genetisch codierbaren Verfahren durch eine bessere Stabilität der Aktivatoren aus und lassen sich zellspezifisch einbringen. cAMP-Steigerungen können wiederholt, im Falle von SMICUS allerdings auch nur nach wiederholter Zugabe von Bicarbonat ausgelöst werden. Die Verknüpfung der codierbaren Werkzeuge mit speziellen Targetsequenzen in SMICUS ermöglicht zusätzlich, cAMP-abhängige Prozesse in verschiedenen Zellkompartimenten anzusteuern. Dabei ist der Einsatz der biologischen Puffersubstanz Bicarbonat als stimulierendes Agens zellphysiologisch besonders verträglich. Andererseits ist genau aus diesem Grund die Anwendung von SMICUS in lebenden Tieren problematisch. Durch die Verwendung von Photorezeptoren als cAMP-manipulierende Werkzeuge werden genetische Codierbarkeit und lichtabhängige Stimulation kombiniert. Die Verwendung von Licht als Stimulans ermöglicht zeitlich wie räumlich eine präzisere Kontrolle der Anregung. Dadurch sind darüber hinaus lebende Tiere in die Anwendung mit eingeschlos-

sen. Die Aktivierung der Photorezeptoren verläuft dabei wie beim cAMP-*Uncaging* auf schneller Zeitskala (im μs bis ms Bereich). Signifikante cAMP-Steigerungen werden je nach Anforderung im Subsekunden bis im Minutenbereich erzielt. Sowohl bPAC als auch JellyOP verfügen über eine basale Aktivität, die bei starker Expression bereits im Dunkeln eine Wirkung haben kann. Beide Werkzeuge unterscheiden sich in ihrer zellulären Lokalisation. Gegenüber JellyOP besitzt bPAC den mit der direkten Wirkungsweise verbundenen Vorteil einer schnelleren Aktivierung. bPAC ist in bakteriellen, sowie in niedrigen und höheren eukaryotischen Zellsystemen funktionsfähig. Ihre Anwendung erfordert keine exogene Zugabe von Kofaktor oder anderer Agenzien. bPAC ist demnach ein effektives, stabiles und zellverträgliches Werkzeug, mit dem intrazelluläre cAMP-Spiegel in Zellen oder lebenden Tieren spezifisch, wiederholbar und mit einer Zeitauflösung im Subsekunden- (Aktivierung) bis Minutenbereich (Inaktivierung) durch Licht kontrolliert werden können.

3.5 Bewertung der funktionellen Analyse von bPAC

Photorezeptoren transformieren auf molekularer Ebene Licht in biologische Aktivität. In der durch BLUF-Domänen aktivierten Zykklase bPAC würde sich Lichtanregung demnach in Form konformeller Änderungen von Kofaktor-nahen Aminosäureresten bis in weiter entfernte Sekundärstrukturbereiche fortpflanzen, um letztlich eine optimierte Ausrichtung der katalytischen Orte und die damit verbundene Aktivitätssteigerung der Zykklase zu bewerkstelligen. Dieser Ansatz schließt die Prinzipien der Signalweiterleitung zwischen Sensor und Effektor sowie die Klärung der in diesen Prozess involvierten Aminosäuren ein. Darüber hinaus können funktionelle und anwendungsrelevante Implikationen hergestellt werden.

Die Sequenzanalyse in Kapitel 1.7 legt die Vorstellung nahe, dass bPAC ein funktionelles Dimer bildet. Dies bestätigen Gelfiltrationsuntersuchungen an gereinigtem Protein (Abb. 2.10). Im Dimer von Klasse III Adenylatzyklasten sind die an der Ausbildung des katalytischen Zentrums beteiligten Sekundärstrukturelemente aus beiden Untereinheiten antiparallel zueinander angeordnet (Abb. 3.5 C). Ausgehend davon sind verschiedene räumliche Anordnungen der BLUF- und Zykklase-Domänen möglich: Nimmt man eine Domänen-Organisation wie on der BLUF-regulierten Phosphodiesterase BlrP1 (3GFY) an (Abb. 3.5 B), so ergibt sich eine räumliche Anordnung, in der die BLUF-Domänen getrennt voneinander vorliegen. Angelehnt an die Struktur der pH-regulierten Zykklase Rv1264 ist eine Domänen-Organisation möglich, in der auch die BLUF-Domänen eine Dimergrenzfläche besitzen (Abb. 3.5 A). Unter der Annahme eines gemeinsamen Orga-

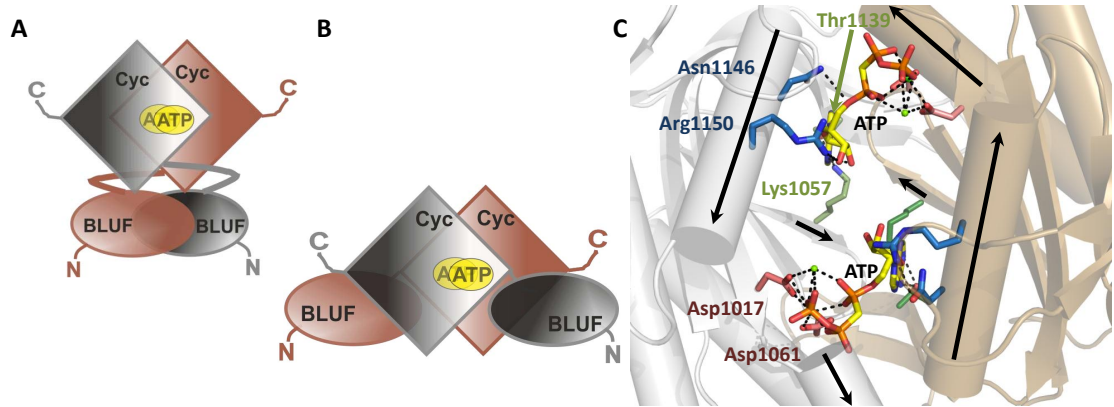


Abbildung 3.5: Antiparallele Organisation von Zyklasen und bPAC-Dimeren

A und **B** Schema von bPAC als Dimer mit den Flavin-bindenden BLUF-Domänen und den katalytischen Zyklase-Domänen (Cyc). **A** In Anlehnung an die Struktur der pH-regulierten Zyklase Rv1264 [164] sind die beiden bPAC-Untereinheiten (grau und braun) so angeordnet, dass sich bei gemeinsamer Grenzfläche innerhalb der BLUF- und Zyklase-Domänen eine antiparallele Ausrichtung dieser ergibt. Die Orientierung der Domänen von N- nach C-terminal ist durch einen Farbgradienten (hell nach dunkel) angezeigt. **B** In Anlehnung an die Struktur der über BLUF-Domänen regulierten Phosphodiesterase BlrP1 [5] sind die beiden Zyklase-Domänen (grau und braun) antiparallel orientiert (Farbgradient), während die BLUF-Domänen getrennt vorliegen. **C** Vergrößerte Darstellung der katalytischen Zentren der cyanobakteriellen CyaC (1WC5). Die Bindung des Substrates (α,β -MethylenATP, gelb) und der vier Metall-Ionen (grün) erfolgt durch die essentiellen Aminosäuren (Asp1017, Lys1057, Asp1061, Thr1139, Asn1146, Arg1150) an der Grenzfläche zwischen den beiden Untereinheiten (grau und braun). Dabei sind die beteiligten Sekundärstrukturelemente antiparallel angeordnet (schwarze Pfeile).

nisationsprinzipes löslicher Zyklasen wird dieses Modell auch für bPAC angenommen. Es schließt als regulatorisches Prinzip auch Wechselwirkungen zwischen den beiden BLUF-Domänen ein.

Unabhängig von der Domänenanordnung sind für die Funktionsweise der über BLUF-Domänen regulierten Zyklase unter anderen zwei Szenarien denkbar:

1. Die intrinsische Aktivität der isolierten, unregulierten Zyklase entspricht der einer inaktiven Zyklase: Photoaktivierung der Zyklase wird durch die BLUF-Domänen vermittelt, indem diese die katalytischen Zentren der Zyklase in ihre aktive Konformation ausrichten (Abb. 3.7 A).
2. Die isolierte Zyklase liegt im Dunkeln in ihrem aktiven Zustand vor: Die Anwesenheit der BLUF-Domänen unterbindet Zyklaseaktivität im Dunkeln. Lichtaktivierung löst die Restriktionen und lässt enzymatische Aktivität zu.

Die Analyse der isolierte Zyklase ergibt, dass ihre spezifische Aktivität im Bereich der Dunkelaktivität von bPAC liegt (Abbildung 2.27). Die Zyklase ist in Abwesenheit der

regulatorischen BLUF-Domänen inaktiv. Damit ist das Szenario einer durch die BLUF-Domänen aktivierten Zykase (Variante 1) plausibel.

Infolgedessen handelt es sich bei bPAC um ein Enzym, bei dem das enzymatisch wirk-same Zentrum durch Licht in die aktive Konformation überführt wird (Abb. 3.7 A). Die Alternative, dass Licht eine durch BLUF bedingte Hemmung des Enzyms aufhebt, ist damit unwahrscheinlich.

3.5.1 Farbverschobene Varianten

Die Erzeugung von farbverschobenen Photorezeptor-Varianten ist für optogenetische Anwendung von besonderem Interesse, da bei unterschiedlichen Wellenlängen absor-bierende Werkzeuge gleichzeitig eingesetzt, aber unabhängig kontrolliert werden kön-nen. Asparagin-30 und Serin-27 sind in BLUF-Domänen teilweise konservierte Reste, die aufgrund ihrer exponierten Lage zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit dem Chromophor befähigt sind (Abb. 3.6). Experimentelle, sowie theoretische Befunde legen nahe, dass das Fehlen der Hydroxyl-Gruppe an der Position 27 für einen Rotshift des Absorptionsspektrums in BLUF-Domänen verantwortlich ist [11, 42, 62, 63, 136]. Für die durch polare oder geladene Aminosäuren besetzte Position 30 konnte ein Einfluss auf die Koordination des Flavin-Phosphates und auf primäre photochemische Ereignisse gefunden werden [102].

Die in bPAC eingeführten, natürlich vorkommenden Mutationen S27A und N30E bewir-ken einen 15 nm- und einen 7 nm-Rotshift und können in einer Doppelmutante die um 17 bzw. 20 nm verschobenen Spektren von nPAC75 und 35 nachstellen. Quantenmecha-nische Berechnungen an AppA ergeben, dass diese Wirkung der Mutation S27A nicht auf die reduzierte Möglichkeit zur Bildung von Wasserstoffbrücken mit dem Kofaktor zurückzuführen ist. Vielmehr trägt die Hydroxylgruppe des Serins sowohl im Dunkel- als auch im rotverschobenen Zustand speziell zur Delokalisierung und Stabilisierung des Flavin Highest-Occupied-Molekülorbitals (HOMO) bei. Das Entfernen der Hydroxyl-gruppe führt daher zu einer verminderten Elektronen-Delokalisierung und daraus resul-tierenden energetischen Anhebung des HOMOs und erklärt den Rotshift in bPAC-S27A [42]. In bPAC-N30E kann nach gleichem Prinzip die veränderte Wasserstoffbrücken-Konfiguration mit dem Flavin (Abb. 3.6) oder eine Destabilisierung des energetischen Grundzustandes durch Einführen des negativ geladenen Glutamates zu dem detektierten Rotshift führen. Beide Varianten durchlaufen den Photozyklus und besitzen die Fähig-keit, die Zykase-Domänen zu regulieren. Die Befunde schließen eine essentielle Beteili-gung der Reste an der Ausbildung von Photozyklus-Intermediaten, sowie an Aufgaben der Signalübermittlung aus. Das dem Wildtyp ähnliche photodynamische und enzymati-

3 Diskussion

sche Verhalten von bPAC-S27A bestätigt den ausschließlich spektralen Effekt der Substitution an Position 27 [11]. UV/vis-spektroskopische Experimente bei tiefen Temperaturen zeigen eine vergleichsweise starke Feinstrukturierung im homologen Slr1694-S28A auf und liefern Hinweise auf besonders definierte Protein-Chromophor-Interaktionen (pers. Kommunikation, T. Mathes). Ob eine solche Ausrichtung innerhalb der BLUF-Domäne Einfluss auf die Konformation des *Linkers* und der Zykklase haben kann, ist strittig. Die molekulare Ursache für die auf 40 % reduzierte Dunkelaktivität bleibt daher zu klären.

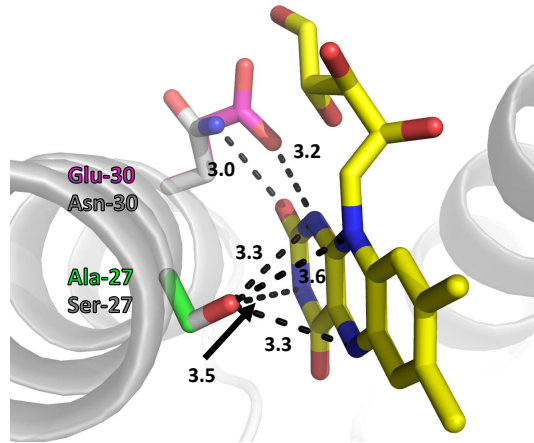


Abbildung 3.6: Aminosäuren mit Einfluss auf die Kofaktorabsorption

Asparagin-30 (grau) befindet sich in BLUF-Domänen auf der polaren Seite des Isoalloxazin-Ringes in Wasserstoffbrücken-Distanz zum Flavon $C_2=O$. Das nach dem Vorbild von nPAC35 und nPAC75 in bPAC-N30E eingeführte Glutamat (pink) geht veränderte Wasserstoffbrückenbindungen mit dem N1 des Kofaktors ein. Serin-27 (grau) hat eine zentrale Lage inne und ist an elektronischen Übergängen des Kofaktors beteiligt [42]. In der Variante bPAC-S27A fehlt die interagierende Hydroxylgruppe. Gezeigt ist ein Ausschnitt der modellierten Struktur der bPAC BLUF-Domäne und Varianten nach Berechnung der jeweiligen Energieminima.

Im Vergleich zum Wildtyp besitzt bPAC-N30E hingegen eine gesteigerte Lichtaktivität. Darin kann sich eine stärkere Anreicherung von Signalzustand aufgrund der langsameren Dunkelrelaxation widerspiegeln. Anregung des Flavins hat in BLUF-Domänen Elektronen- und Protonentransfer durch nahe gelegene Aminosäuren zur Folge. Kurzzeitspektroskopische Messungen an Varianten der entsprechenden Position in Slr1694 ergaben, dass an dieser Stelle eingeführte Ladungen erwartete Änderungen des Redoxpotenzials bewirken, die sich direkt auf die Rate des photoinduzierten Elektronentransfers auswirken [102]. So weisen die Varianten Slr1694-N31H und -N31R gegenüber dem Wildtyp verlängerte Lebenszeiten des angeregten Zustandes und damit verlangsamte Elektronentransfer-Geschwindigkeiten auf. Die reduzierten Geschwindigkeiten korrelieren

ren mit einer verminderten Quantenausbeute des Signalzustandes. Dieser Zusammenhang ist auch konsistent mit der Besetzung der entsprechenden Position in nPAC35 und nPAC76 und deren photodynamischen Eigenschaften [127, 130]: Speziell in nPAC35 ist die korrespondierende Position durch Glutamat besetzt. Ein durch die negativ geladene Aminosäure beschleunigter Elektronentransfer könnte Ursache für die hohe Quantenausbeute des Signalzustandes mit $\Phi_S = 87\%$ sein. Demzufolge könnte auch das in bPAC-N30E eingeführte Glutamat zu einer erhöhten Quantenausbeute führen und über eine Verschiebung des photodynamischen Gleichgewichtes zur beobachteten Aktivitätssteigerung beitragen.

3.5.2 Varianten mit Einfluss auf die Signaltransduktion und kinetische Varianten

Für das Verständnis der Signalweiterleitung in bPAC ist es wichtig, die beteiligten Aminosäure-Reste ausfindig zu machen. In BLUF-Domänen sind das konservierte Methionin-93 und das semi-konservierte Tryptophan-91 Teil eines im Licht beweglichen β 5-Faltblattes [159, 183, 196] und weisen Verbindung zum Chromophor-umgebenden Wasserstoffbrücken-Netzwerk auf [5, 66, 67]. Beide Reste befinden sich damit in einer Schlüsselposition für die Signalweiterleitung.

Die Varianten bPAC-W91F, -W91A und -M93A sind in der Lage ihrer Spektren identisch mit dem Wildtyp. Die spektroskopischen Befunde schließen daher eine unmittelbare Beteiligung der Reste an der Chromophor-Absorption aus. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen an anderen BLUF-Domänen [98, 78, 194]. Allerdings beeinflussen die Substitutionen photochemische, kinetische sowie enzymatische Eigenschaften von bPAC und belegen die bedeutende Rolle dieser Reste für dessen Funktionalität (Abb. 2.29).

Die gegenüber dem Wildtyp erhöhte Lichtaktivität der Photozyklus-aktiven Variante bPAC-M93A kann wie in bPAC-N30E durch eine kinetisch bedingte stärkere Anreicherung an aktiver Spezies erklärt werden. Zusätzlich lässt sich aus der signifikant erhöhten Dunkelaktivität und der damit verbundenen Reduzierung des Licht-zu-Dunkelverhältnisses auf den Faktor 1.8 ableiten, dass die Mutationen die intakte Beschaffenheit der BLUF-Domäne und deren Regulationsfähigkeit beeinträchtigt. Ein im Dunkeln und im Licht ähnliches Aktivitätsverhalten wurde ebenfalls in entsprechenden Methionin-Varianten von Slr1694 beobachtet und weist auf beeinträchtigte Funktionalität hin [100, 196].

Mit der Einführung verschiedener Substituenten an Position 91 (W91A und W91F) wurden zwei Photozyklus-aktive bPAC-Varianten mit verkürzter und verlängerter Photozyklusdauer geschaffen. Eine 1.5-fache Beschleunigung des Zyklus wurde durch das

3 Diskussion

Ersetzen der Tryptophan-Seitenkette mit dem kurzkettigen Alanin erreicht. Dagegen bewirkte der Erhalt des aromatischen Charakters durch Einführen von Phenylalanin eine Verlangsamung auf das 8-Fache. Eine Erklärung für den gegensätzlichen Effekt der Mutationen kann in den sterisch unterschiedlichen Anforderungen der Substituenten gefunden werden. In noch stärkerer Ausprägung wurde derselbe Effekt in Slr1694 beschrieben. Andererseits führten in AppA beide Mutationen zu einer Verkürzung der Photozyklusdauer [11, 78]. Dies weist auf funktionelle Unterschiede innerhalb der BLUF-Rezeptorfamilie hin.

Die beiden Varianten bPAC-W91F und -W91A besitzen darüber hinaus eine gegenüber dem Wildtyp bis zu 50 % geringere Lichtaktivität und zeigen einen von 12 nm auf 9 bzw. 10 nm reduzierten Rotshift im Licht. Letzterer Befund kann bedeuten, dass sich der native Signalzustand nur in einer Fraktion der vorhandenen Moleküle ausbildet und somit eine Heterogenität von bPAC-W91F und -W91A in Lösung anzeigt. Die verminderte Rotverschiebung kann allerdings auch Anzeichen für die Bildung eines anderen Intermediates sein, das sich durch eine Teilverschiebung gegenüber dem nativen Signalzustand auszeichnet. Die Ursache hierfür wäre zunächst in Änderungen des Wasserstoffbrücken-Netzwerkes unmittelbar um das Flavon $C_4=O$ zu suchen (Flavon-Nomenklatur siehe Abb. 3.8 A). Bedenkt man die 14.5 Å-Distanz zwischen Trp-91 und dem Flavon $C_4=O$, die sich aus dem Homologie-Modell ergibt, so ist dies unwahrscheinlich. Eine Differenzierung ist aufgrund der experimentellen Befunden nicht möglich; beide Szenarien können zu einer verminderten Aktivität im Licht führen (Abb. 3.7 C). Die dabei zwischen den Varianten auftretenden Aktivitätsunterschiede können erneut auf einen kinetischen Effekt durch die unterschiedliche Lebensdauer des Signalzustandes zurückzuführen sein.

Neben der verminderten Lichtaktivität zeigen die Tryptophanvarianten auch im Dunkeln eine erhöhte Aktivität. Das Licht-zu-Dunkelverhältnis liegt bei 1.6 (W91F) und 2.7 (W91A) und weist wie auch in bPAC-M93A auf funktionelle Beeinträchtigung des Enzyms hin. Dies bestätigt auch für Tryptophan eine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung von Stabilität und Funktionalität in bPAC und deckt sich mit Literatur-Berichten an entsprechenden Varianten des Antirepressors AppA [101]. Aus den genannten Gründen sind bPAC-W91A und W91F jedoch für Anwendungszwecke ungeeignet.

Ungeklärt ist insbesondere die molekulare Ursache für den durch die Mutationen W91F, W91A und M93A erzielten Anstieg der Dunkelaktivität bPACs. Vor dem Hintergrund einer BLUF-aktivierten Zykase ist die Tatsache, dass eine funktionelle Beeinträchtigung der Sensor-Domäne zu einer erhöhten Basalaktivität des Enzyms führt, unerwartet. Gardner und Kollegen entwarfen anhand ihrer Ergebnisse aus strukturellen Untersuchungen an Slr1694 folgendes Modell [196]: Mutationen an M93 beeinträchtigen die Fä-

3.5 Bewertung der funktionellen Analyse von bPAC

higkeit Slr1694s zur Interaktion mit seinem Effektor und verhindern die Ausbildung des biologischen Dunkelzustandes. Auf molekularer Ebene ist dieses Verhalten durch eine erhöhte Flexibilität von Sekundärstrukturelementen speziell im Bereich des β 5-Faltblattes gekennzeichnet, in dessen Nachbarschaft sich auch W91 und M93 befinden. In AppA beschrieben Jung *et al.*, dass Photoaktivierung mit einer Bewegung von Methionin und konformellen Änderungen des oben erwähnten β 5-Faltblattes einhergeht [67]. Nach Gardners Modell führen demnach Mutationen, die die Flexibilität des β 5-Faltblattes erhöhen, zur Ausbildung eines pseudo-Lichtzustandes. Dieser Zustand ist bereits im Dunkeln durch aktives oder teilaktives Verhalten gekennzeichnet (Abb. 3.7). Die erhöhte Beweglichkeit des β 5-Faltblattes stellt demnach wahrscheinlich einen Teil des Aktivierungssignals nach Lichtanregung dar. Auch das Verhalten der Varianten bPAC-W91F, -W91A und -M93A erscheint vor dem Hintergrund dieses Modells plausibel.

Grundsätzlich führte weder die Entfernung des Tryptophans noch des Methionins zu

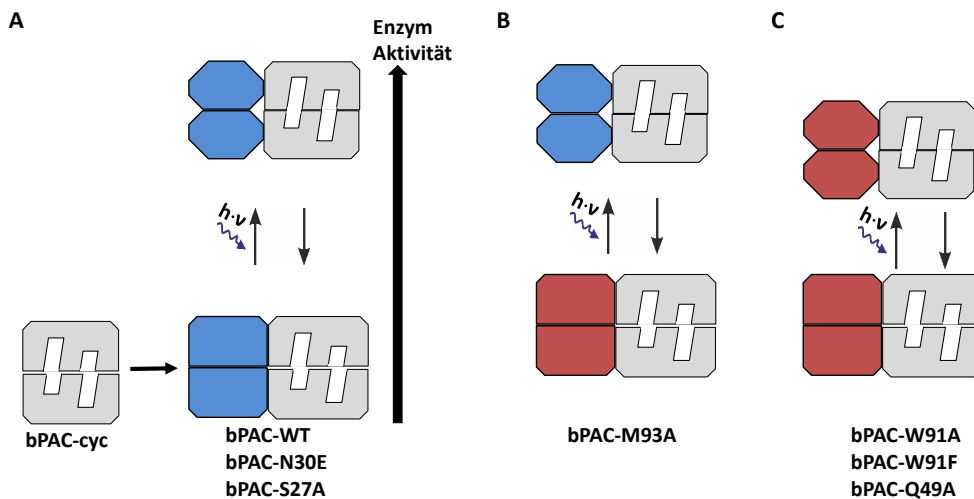


Abbildung 3.7: Konzept einer BLUF-aktivierten Zykase

A Eine inaktive, isolierte Zykase bPAC-cyc (grau) impliziert eine lichtaktivierende Funktion der BLUF-Domänen (blau). Nach diesem Konzept bewirkt Photoaktivierung eine Steigerung der Enzymaktivität durch eine optimierte Ausrichtung der katalytischen Zentren. Dieses Verhalten trifft auf bPAC-WT und auf die Varianten bPAC-S27A und bPAC-N31E zu. **B** Mutation der BLUF-Domäne an Methionin-93 erhöht die Aktivität im Grundzustand. Die Aktivität im Licht bleibt erhalten. **C** Mutation der BLUF-Domäne an Tryptophan-91 und Glutamin-49 erhöht die Aktivität im Grundzustand und reduziert die Aktivität des photoaktiven Zustandes.

einer vollständigen Entkopplung von Photoaktivierung und Zykaseaktivität. Vielmehr scheint beiden Resten eine Teilfunktion im Signaltransduktionsprozess zu zukommen. Dies steht im Gegensatz zu Befunden an Slr1694, wo Methionin allein für die Signalweiterleitung verantwortlich ist [196].

3.5.3 Photozyklus-inaktive Varianten und radikalbildende Variante

Primäre photochemische Ereignisse im BLUF-Photozyklus umfassen Elektronen- und Protonentransfer aus der umgebenden Proteinmatrix. Die Bildung des rotverschobenen Intermediates erfolgt unter Einbeziehen des lokalen Wasserstoffbrücken-Netzwerkes und ist speziell durch eine verstärkte Interaktion mit dem Flavin $C_4=O$ gekennzeichnet. Das in BLUF-Domänen konservierte Tyrosin-7 und Glutamin-49 sind Teil dieses unmittelbaren Netzwerkes und als primärer Elektronendonator bzw. Wasserstoffbrücken-Interaktionspartner direkt involviert [45, 79, 178].

Der Austausch der beiden reaktiven Aminosäuren verhindert die Ausbildung der essentiellen Wasserstoffbrücken zum N_5 und $C_4=O$ des Flavins und die Entstehung des rotverschobenen Intermediates in bPAC, wie es auch in anderen BLUF-Domänen beschrieben ist [23, 73, 123, 174, 184, 196]. Infolgedessen sind die bPAC Varianten-Y7F und -Q49A Photozyklus-inaktiv. Die veränderte Polarität der neuen Substituenten bewirkt eine geringe konstitutive Blau- bzw. Rotverschiebung der Absorptionsspektren (bPAC-Y7F: 439 nm, bPAC: 441 nm, bPAC-Q49A: 443 nm).

Nach allgemeiner Auffassung wird die biologische Aktivität von Photorezeptoren aus dem lichtinduzierten Signalzustand vermittelt. Unter der Annahme, dass das rotverschobene Intermediat den Signalzustand in BLUF-Photorezeptoren darstellt, sind die Varianten bPAC-Y7F und -Q49A erwartungsgemäß mit einem inaktiven und unregulierten Enzymverhalten verbunden. Tatsächlich reduzieren die eingeführten Mutationen die Lichtaktivierung bPACs auf weniger als ein Zehntel des Wildtyps und zeigen prinzipiell den Verlust der Lichtregulierung an. Dennoch weist bPAC-Q49A eine residuale, 1.8-fache Aktivitätssteigerung im Licht auf. In bPAC-Y7F kehrt sich die Licht-Abhängigkeit um, und führt zu einer 0.7-fachen Reduktion der Aktivität unter Belichtung. In beiden Fällen geht dies mit einer 8-15-fachen Zunahme der Dunkelaktivität einher.

Wertet man das Auftreten der permanenten 2 nm-Teilrotverschiebung im Spektrum von bPAC-Q49A als Anzeichen für die Ausbildung eines konstitutiven pseudo-Lichtsignalzustandes, so kann dies die vergleichsweise hohe Dunkelaktivität der Variante erklären. Diese Interpretation wird durch spektroskopische und biochemische Untersuchungen an AppA-Q63E gestützt [23]: AppA-Q63E weist ebenfalls eine permanente 3 nm-Rotverschiebung der Flavinabsorption auf und ist unfähig, den Interaktionspartner PpsR im Dunkeln zu binden. Die NMR-basierte Strukturanalyse von AppA-Wildtyp und der Variante ergibt, dass der konformelle Zustand von AppA-Q63E dem des Wildtyps im Licht ähnlich ist. Weiter führen Bauer und Mitarbeiter die Bildung des pseudo-Lichtzustandes und der konstitutiven Teilrotverschiebung in AppA-Q63E auf stärkere Wasserstoffbrücken der Glutamat-Seitenkette zu Tyr-21 und $C_4=O$ des Flavins, sowie

auf eine geschwächte oder fehlende Wasserstoffbrücke zum Flavin N₅ zurück. Auch ohne dass Anzeichen für die Ausbildung von Signalzustand im Spektrum sichtbar werden, zeigt bPAC-Y7F sowie die entsprechende Slr1694-Y8F Variante und die euPAC α -Y60F Variante ein aktives Verhalten bereits im Dunkeln [90, 196]. Wieder führt das Auftreten eines Großteils äquivalenter, spezifischer Sekundärstrukturänderungen sowohl im Lichtzustand des Wildtyps als auch in Slr1694-Y8F auf Gardners Interpretation des pseudo-Lichtzustandes in Tyrosin-Varianten zurück [99, 194]. In Slr1694-Y8F führt speziell die fehlende Wasserstoffbrücke zwischen Tyr-8 und Gln-50 zu einer verstärkten Beweglichkeit der über das Wasserstoffbrücken-Netzwerk unmittelbar interagierenden Aminosäuren und zu einer Heterogenität des pseudo-Lichtzustandes. Letztlich trifft diese Interpretation auf alle an bPAC vorgenommenen Mutationen mit Ausnahme der natürlich Vorkommenden zu (Abb. 3.7 B und C). Auf molekularer Ebene kann sich die Ausbildung eines pseudo-Lichtzustandes in Störungen des Wasserstoffbrücken-Netzwerkes, in einer veränderten BLUF-Zyklasen-Interaktion oder einer Beeinträchtigung der Dimer-Assoziation zeigen und so die Regulationsfähigkeit des Enzyms stören.

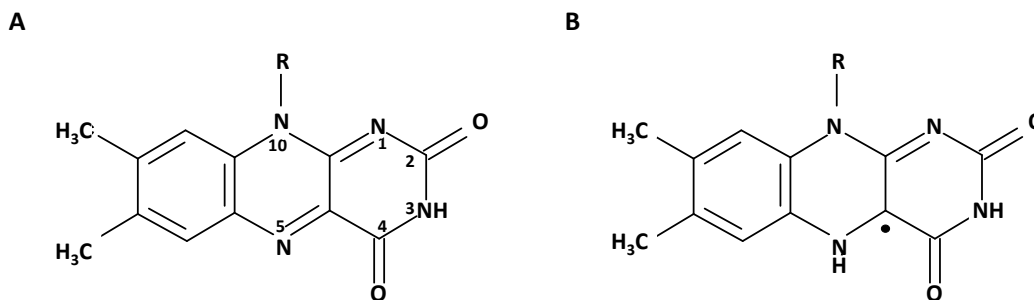


Abbildung 3.8: Flavin-Photoprodukte

A Strukturformel von Flavin in seinem oxidiertem Zustand. Die Zahlen geben die Nummerierung wichtiger Atome des Isoalloxazin-Ringes an. **B** Strukturformel von Flavin als neutrales Semichinonradikal. R bezeichnet die Ribitylkette.

Die molekularen Ursachen der noch vorhandenen Lichtaktivierung in bPAC-Q49A und besonders die invertierte Lichtabhängigkeit in bPAC-Y7F können anhand der durchgeführten Untersuchungen nicht vollständig geklärt werden. Eine durch Temperaturzunahme bedingte Aktivitätssteigerung während Belichtung wurde ausgeschlossen. Denkbar ist, dass sowohl elektrostatische Wechselwirkungen im angeregten Zustand als auch die Entstehung alternativer Photoendprodukte (Abb. 3.8) Auswirkungen auf das umgebende Wasserstoffbrücken-Netzwerk haben. Konformell erforderliche Anpassungen der BLUF-Domäne können kleinere Aktivitätsänderungen erklären. Ein entsprechender Mechanis-

mus ist beispielsweise in Cryptochromen als lichtinduzierte Photoreduktion beschrieben [16]. Dort stellen Cryptochrome, die oxidiertes Flavin oder Flavin-Neutralradikal enthaltenden, unterschiedliche Aktivitätszustände desselben Proteins dar [7]. Die Ausbildung des Semichinonradikals wäre demnach eine naheliegende Ursache für die im Licht reduzierte Aktivität von bPAC-Y7F. Eine zeitliche Korrelationen zwischen Radikalbildung und Aktivitätsverlauf konnte allerdings experimentell nicht gefunden werden und sollte mit spektroskopischen Methoden geprüft werden.

Die lichtinduzierte Bildung des langlebigen Neutralradikals in der Variante bPAC-Y7F ist für BLUF-Domänen ungewöhnlich. Zwar führt starke, andauernde Belichtung in einigen BLUF-Domänen zur vorübergehenden Entstehung anionischer oder neutraler Semichinon-Spezies; jedoch sind die Ausbeuten nur moderat und liegen für das Neutralradikal unterhalb von $1 \cdot 10^{-4}$ [127]. Zugehörige Lebenszeiten liegen meist im unteren Minuten-Bereich (siehe auch Kapitel 2.2.3). Die Ausbildung eines anionischen Flavinradikals in der korrespondierenden Tll0078-Y8F Variante war auf Temperaturen um 80 K beschränkt [31]. Aufgrund ihrer Langlebigkeit könnte die bPAC-BLUF-Y7F Domäne als intrazellulärer Radikalmarker verwendet werden.

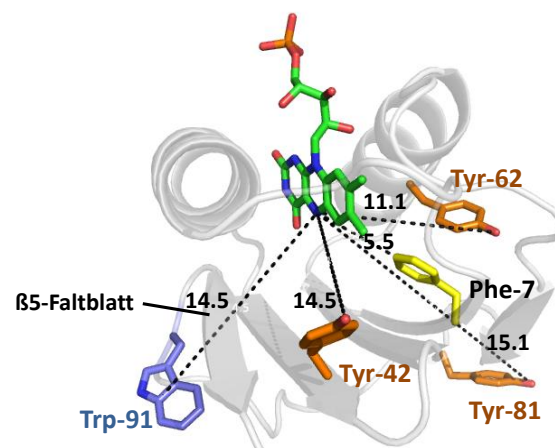


Abbildung 3.9: Kompetitiver Elektronentransfer in bPAC

Aminosäuren mit potenzieller Elektronendonorfunktion und ihre Distanz zum Flavin Stickstoff N₅ in bPAC-Y7F. Phe-7 mit einem Abstand von 5.5 Å, Trp-91 mit 14.5 Å, Tyr-42 mit 14.5 Å und Tyr-81 mit 15.1 Å sind mögliche Kandidaten für Elektronentransfer auf das angeregte Flavin. Tyr-62 ist aufgrund seiner geringen Distanz von 11.1 Å und seinen elektronischen Eigenschaften in bevorzugter Position. Gezeigt ist ein Ausschnitt der modellierten Struktur der bPAC-BLUF-Domäne.

Von besonderem Interesse ist daher die Ursache für die Langlebigkeit des Semichinons, sowie das Auffinden des Radikalpartners. Die Stabilität einer radikalischen Spezies wird

3.6 Über die Signaltransduktion und Lichtregulation in bPAC

häufig durch eine räumliche Trennung der Radikalpartner verursacht, die die Ladungsrekombinationsrate entsprechend herabsetzt. Die dazu notwendige Distanz kann durch lichtinduzierte Konformationsänderungen erzeugt werden. Aufgrund des Redoxpotenzials von Phenylalanin kommt der Substituent des nativen Donors Phe-7, sowie Phe-47, -48 und -88 als Elektronenquelle und Radikalpartner nicht in Frage. Einziger alternativer Elektronengeber in einer Elektronentransfer-Distanz bis zu maximal 14 Å ist Tyrosin-62 (11 Å) (Distanzen der theoretisch berechneten bPAC-Struktur, Abb. 3.9). Tryptophan-91, für das kompetitiver Elektronentransfer in AppA nachgewiesen wurde [34, 78], nimmt nach dem bPAC-Strukturmodell eine auswärtsgerichtete Konformation mit einer Distanz von 15 Å zum Flavin ein. In dieser Entfernung ist Tryptophan-91 als Elektronendonator weniger wahrscheinlich. Die Situation ist äquivalent zu Slr1694, wo eine nicht-produktive Desaktivierung durch Tryptophan-91 (14 Å Abstand) experimentell ausgeschlossen wurde [11]. Da Tyrosin-62 sowohl in bPAC und in Slr1694, nicht jedoch in AppA vorhanden ist, würde seine Funktion als Radikalpartner in bPAC-Y7F und als alternativer Elektronendonator in bPAC und Slr1694 die unterschiedlichen Befunde zu Tryptophan erklären. Der Nachweis an einer Doppelmutante ist noch zu führen.

3.6 Über die Signaltransduktion und Lichtregulation in bPAC

Lichtanregung pflanzt sich aus dem Zentrum der BLUF-Domäne über das β 5-Faltblatt und die β 4/5-Schleife in die α -helikale *Linker*- bzw. *Cap*-Region des C-Terminus fort [184]. Dabei geht Photoaktivierung allgemein mit einer erhöhten Flexibilität des β 5-Faltblattes einher und stellt den wesentlichen Teil eines gemeinsamen Aktivierungssignals in BLUF-Domänen dar [183]. Allerdings ruft auch die Modifikation essentieller Interaktionen oder Struktur bestimmender Elemente eine erhöhte Mobilität der genannten Bereiche hervor und imitiert damit partiell das Aktivierungssignal. Der entscheidenden Zyklaste-aktivierenden Strukturänderung muss demnach eine Zunahme an Beweglichkeit in der β 4/ β 5-Region der BLUF-Domäne vorangehen.

Über die Prinzipien, die auf molekularer Ebene die Aktivität von Adenylatzyklen regulieren, ist vergleichbar wenig bekannt. Untersuchungen an Klasse IIIb Zyklen (CyaB aus *Pseudomonas aeruginosa*, Rv1264 und Rv1900c aus *Mycobacterium tuberculosis*, CyaC aus *Spirulina platensis* oder die Guanylatzyklen Cya2 aus *Synechocystis* PCC6803 und sGC aus *Chlamydomonas reinhardtii*) beschreiben übereinstimmend folgende Merkmale der Aktivierung:

Der katalytische Zyklus in isolierten Zyklaste-Domänen besteht aus einem Gleichgewicht

3 Diskussion

zwischen der offenen, inaktiven und der geschlossenen, aktiven Konformation. Der Übergang zwischen beiden Konformationen wird durch Substratbindung, durch Bindung des zweiten Metall-Kofaktors oder anderer Effektoren induziert. Strukturell unterscheiden sich aktiver und inaktiver Zustand durch die räumliche Anordnung und in der optimalen Ausrichtung der katalytischen Zentren. Einheitliches Charakteristikum bei der Ausbildung des aktiven Zustandes ist eine Bewegung der α 1-Helix in Richtung des aktiven Zentrums [137, 152, 155, 168, 180].

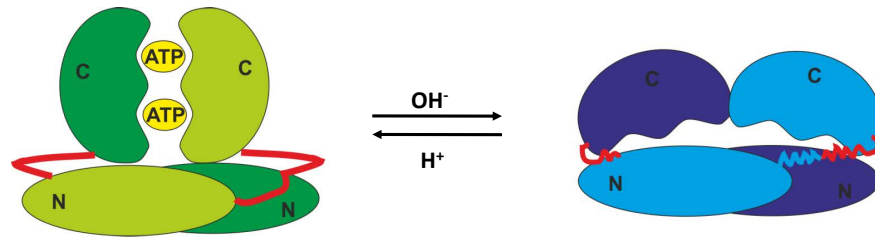


Abbildung 3.10: Regulation der pH-sensitiven Adenylatzyklase Rv1264 aus [164]

Domänen-Interaktion der pH-sensitiven Adenylatzyklase Rv1264 nach Aktivierung. Ein Absenken des pH-Wertes bewirkt ausgehend von den regulatorischen Domänen (N) strukturelle Änderungen, die katalytischen Domänen (C) zueinander ausrichten. Die Ausrichtung erfordert sowohl eine Translation und als auch eine Rotation der Zyklastomänen und ist von einer erhöhten Flexibilität der *Linker*-Region (Lösen der α -Helix) und der Neuausbildung einer α -Helix innerhalb der Zyklastomänen begleitet. Nachgedruckt mit Erlaubnis von AAAS.

Einziges Kristallstruktur-Beispiel einer durch eine regulatorische Domäne gesteuerten Adenylatzyklase ist die pH-regulierte AC Rv1264 aus *Mycobacterium tuberculosis*.

Rv1264 ist eine lösliche Klasse III AC, die aus einer N-terminalen pH-sensitiven und einer C-terminalen Zyklastomäne besteht. In ihrem inaktiven Zustand bewirken die Sensor-Domänen eine strukturelle Trennung der Zyklastomänen, die die katalytischen Reste des aktiven Zentrums räumlich um 40 \AA voneinander separiert (Abb. 3.10). Der Übergang in den aktiven Zustand ist von ausgeprägten Strukturänderungen begleitet. Die Neubildung der α 1-Helix innerhalb der katalytischen Domäne und das Entfalten einer *Linker*-Helix führen zur Orientierung und Assemblierung des Dimer-Grenzflächen und der aktiven Zentren. Dieser Prozess ermöglicht die Steigerung der Aktivität von $3 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (pH 8) auf $100 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ bei pH 6. Die isolierte Zyklastomäne ist konstitutiv aktiv und weist eine Aktivität von $400 \text{ nmol cAMP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ auf [164]. Im Falle der CyaB aus *Pseudomonas aeruginosa*, einer Zyklastomäne

mit N-terminaler Membran-assoziations-Domäne, ist die isolierte Domäne teilaktiv. Die volle Aktivität wird nur im Volllängenprotein erreicht [168].

bPAC ist als isolierte Zykase inaktiv und zeigt nur in Gegenwart der Sensor-Domänen und unter Belichtung volle Zykaseaktivität. Das impliziert, dass die strukturelle Flexibilität des *Linkers* allein die Zykase nur unvollständig aktivieren kann, sondern vielmehr die molekulare Grundlage für die Herausbildung der eigentlich aktivierenden Strukturänderung ist. Unterstützt wird dies durch den Befund der FTIR-spektroskopischen Untersuchungen an bPAC und bPAC-BLUF mit *Linker* (Abb 2.16). α -helikale lichtinduzierte Strukturänderungen treten nur im Volllängenkonstrukt, nicht aber in der isolierten Zykase auf. Dies lässt vermuten, dass die Zykaseaktivierung mit der Assoziation einer α -Helix verbunden ist, welche letztlich zu einer optimalen Justierung der aktiven Zentren führt. Dies ist konsistent mit den in Rv1264 und anderen Zykassen gefundenen Strukturänderungen. Parallelen weist dieser Befund auch zu dem Verhalten von LOV-Domänen auf: Photoaktivierung resultiert hier in ein Entfalten der J α -Helix und wird im FTIR-Differenzspektrum in Form einer entsprechend negativen Bande sichtbar [187]. Eine abschließende Klärung und ein umfassendes Verständnis von Signaltransduktion und Lichtregulierung in bPAC wird erst auf der Grundlage einer Kristallstruktur und der Dynamik lichtinduzierter Strukturänderungen möglich sein.

3.7 Perspektiven

Die Einführung bPACs als Werkzeug zur optischen Kontrolle von cAMP hatte eine große Resonanz interessierter Anwender zur Folge. Die angedachte Verwendung bPACs war meist analytischer Natur und die Einsatzgebiete erstreckten sich auf die Erforschung cAMP-abhängiger Signaltransduktion im Zusammenhang mit molekularen Prozessen wie Sekretion, Zytoskelett-Assemblierung oder mit physiologischen Vorgängen wie synaptischer Plastizität, Hormonwirkung in *Drosophila*-Fliegen oder Induktion von Schlaf in Zebrafischen (siehe Tabelle 3.11). Daneben wurden bereits zwei weitere Anwendung von bPAC zur optischen Kontrolle von Zell-Morphologie, Antibiotika-Sensitivität und Biofilm-Produktion in *E. coli* und eine funktionelle Studie zur cAMP-abhängigen Signaltransduktion im Ausscheidungssystem von *Drosophila* veröffentlicht [27, 190].

Besondere medizinische Relevanz besitzt die Erforschung cAMP-abhängiger Signaltransduktionswege in der Neurobiologie. In Neuronen von Invertebraten bis Säugern reguliert cAMP die Transmitterausschüttung in den synaptischen Spalt und hat ent-

cAMP-abhängiger Prozess	Zellsystem / Organismus	Gruppe
Insulin-Sekretion	humane Pankreas β -Zellen	AG Chen, Peking University, Beijing AG Zhang, Johns Hopkins Univ., Baltimore
Zytokin-Produktion	T-Lymphozyten d. Maus	AG Berlot, Weis Center, Danville
Ionen-transport, Pathologie der Mucoviszidose	humane Lungen-Epithelzellen	AG Machen, Univ. of California, Berkeley
Calcium-Signaltransduktion und Kompartimentierung	humane Darm-Epithelzellen	AG Hofer, Harvard Medical School, West Roxbury
Axonaler Transport, Transmitterausschüttung und synaptische Plastizität	Neuronen d. Maus	AG Südhof, HHMI/Stanford Univ., Stanford, AG Ashery, University of Tel Aviv AG Luo, Nat. Inst. of Biol. Sciences, Beijing AG Bozza, Northwestern Univ., Evanston
cAMP-regulierte Signaltransduktion	Trypanosoma	AG Boshart, Biozentrum LMU, Martinsried
Inhibition von Schlaf, Schlafkrankheiten	Zebrafisch Larven	AG Prober, California Inst. of Tech., Pasadena
Hormonelle Signaltransduktion	Drosophila Fliegen	AG White, NIMH, Bethesda
Entwicklung des olfaktorischen Systems	Maus	AG Firestein, Columbia Univ., New York

Abbildung 3.11: Anwendungen von bPAC

scheidenden Einfluss auf synaptische Durchlässigkeit und Plastizität [149]. Diese adaptiven Prozesse beschreiben die Fähigkeit von Neuronen nutzungsabhängig die Stärke der Verbindung entweder zu vergrößern (Potentiation) oder zu verkleinern (Depression) und stehen in Verbindung mit Gehirnfunktionen wie Erinnerung und Gedächtnis. Konventionelle Herangehensweisen zur Erforschung dieser Vorgänge wie elektrische oder chemische Stimulation mittels cAMP-Analoga oder pharmakologischen Agenzien sind oft mit geringer Effektivität, Spezifität und verminderter zeitlich-räumlicher Präzision verbunden [125]. Um die Fähigkeit für Lernen und Erinnerung besser untersuchen zu können, werden Stimulatoren benötigt, die biologische Effekte wie Langzeit-Potenziation (LTP) in Neuronen gezielt auslösen können. Der Einsatz von euPAC α in Neuronen ermöglichte die Induktion synaptischer Transmission und damit die optische, reversible und quantitative Kontrolle spezifischer Ereignisse [14, 179]. Die erzielten physiologischen Effekte waren allerdings schwach ausgeprägt gegenüber Effekten, die durch Kanalarhodopsin vermittelt wurden [85, 179]. Daher erscheinen die besonders im neuronalen Kontext zu Tage tretenden, verbesserten Eigenschaften bPACs wie die große Lichtaktivität und die hohe Lichtsensitivität vielversprechend. Sie machen bPAC zu einem wertvollen optogenetischen Werkzeug, das möglicherweise sogar das Potenzial zur Induktion präsynaptischer LTP besitzt.

Klinisch-therapeutische Anwendungen von cAMP-stimulierenden Substanzen finden sich

beispielsweise auch bei der Behandlung von Schuppenflechte (Psoriasis). Hier können Phosphodiesterasehemmer eingesetzt werden, um die überschießende Proliferation der epidermalen Keratinozyten zu reduzieren [41]. Besonders an natürlich dem Licht exponierten und leicht zugänglichen Bereichen wie der Haut würden auch therapeutische Anwendungen von bPAC am Menschen denkbar sein.

In den vorgestellten Anwendungsbeispielen wird bPAC zur Ansteuerung unterschiedlicher Effektoren, cAMP-Kompartimente und dynamischer Prozesse eingesetzt. Als zytosolisches Enzym kann bPAC nicht allen Anforderungen optimal gerecht werden. Um ein möglichst vielseitiges Anwendungsspektrum zu erreichen, ist einer Weiterentwicklung bPACs hinsichtlich mehrerer Aspekte wünschenswert:

- Für eine lokal unabhängige Kontrolle cAMP-abhängiger Signalkaskaden ist subzelluläres Targeting von bPAC unverzichtbar. Dies wird durch das Einfügen spezieller Signalsequenzen auf genetischer Ebene erreicht [44, 144]. Die lokal gerichtete bPAC-Expression ermöglicht die Manipulation in Organellen oder Kompartimenten wie z.B. dem Kern, den Mitochondrien oder in der Plasmamembran.
- Die zusätzliche Verfügbarkeit von bPAC-Varianten mit Wellenlängen-spezifischer Anregbarkeit würde die gleichzeitige, aber selektive Kontrolle von cAMP ermöglichen. Damit könnten komplexe Interaktionen innerhalb einer Zelle studiert werden. Eine Verlagerung der Anregung in energieärmere Spektralbereiche bringt zusätzlich den Vorteil einer größeren Eindringtiefe, sowie reduzierter Toxizität mit sich. Da Spektralverschiebungen von Flavoproteinen aufgrund der chemischen Natur des Kofaktors nur begrenzt möglich sind, würde die Kombination einer Zykklase mit anderen Photorezeptor-Domänen wie z.B. Domänen aus Cyanobakteriochromen ein interessantes Komplement zu bPAC darstellen.
- Um eine Verbesserung der zeitlichen Kontrollierbarkeit von bPAC zu erreichen, werden speziell kinetische Varianten zur Erzeugung kurzlebiger cAMP-Erhöhungen benötigt. Ebenso sind weitere Beiträge zur Verminderung der Dunkelaktivität sinnvoll.
- Ein anderes bedeutsames Anwendungsfeld stellen cGMP-abhängige Signaltransduktionswege dar. Gegenüber cAMP besitzt der Botenstoff cGMP in Säugern sogar noch größere Relevanz, da wichtige physiologische Funktionen wie z.B. das Sehvermögen oder die Relaxation der glatten Muskulatur und Vasodilatation seiner Kontrolle unterliegen. Die Erschließung dieser Prozesse durch lichtaktivierte Guanylatzyklasen ist ein vielversprechendes Ziel. Das einzig verfügbare optogenetische

3 Diskussion

Werkzeug in dieser Richtung ist bislang die von Gomelsky und Mitarbeitern modifizierte bPAC (BlgC), die durch Einführen einer Dreifachmutation eine erhöhte, jedoch keine ausschließliche cGMP-Spezifität aufweist [142]. Aufgrund ihrer AC-Nebenaktivität und der relativ geringen Lichtaktivität (GC-Aktivität ist 60 % der AC-Aktivität des WT) erscheinen ihre Anwendungsmöglichkeiten begrenzt.

- Unabhängig der Kenntnis über Struktur-Funktions-Beziehungen oder regulative Mechanismen sollte die rationale Herangehensweise zum Design von bPAC-Varianten durch eine Evolutions-gerichtete ergänzt werden. Dieser alternative Ansatz sieht die Generierung von Gen-Bibliotheken mit zufälligen Mutationen und anschließende Selektion funktionaler Varianten vor.

Die Entdeckung und Etablierung der kleinen photoaktivierten Adenylatzyklase bPAC als cAMP-manipulierendes Werkzeug, sowie die anwendungstechnisch interessanten Varianten bPAC-Y7F und bPAC-S27A bereichern die verfügbare Sammlung an lichtsteuerbaren Enzymen und verbessern die Anwendungsmöglichkeiten der Optogenetik. Aufgrund ihrer geringen Größe und ihrer guten Handhabbarkeit ist bPAC für weitere Verfeinerungen in hohem Maße zugänglich und kann künftig einen wertvollen Beitrag bei Aufklärung von Geruchswahrnehmung, der Fähigkeit für Lernen und Erinnerung oder bei der infektiösen Pathogenese leisten.

Auf der anderen Seite machen dieselben Eigenschaften bPAC auch zu einem guten Modellsystem für die BLUF-Photoaktivierung: Gegenüber anderen verfügbaren BLUF-Effektor-Kombinationen (BlrP1, AppA, YcgF, nPACs) ist bPAC ein kleines und einfaches System, das vor allem wegen seiner komfortabel großen lichtabhängigen Aktivitätsänderung, aber auch wegen seines analytisch gut quantifizierbaren Produktes für biophysikalische Untersuchungen geeignet ist.

Um Informationen über die Dynamik lichtinduzierter Strukturänderungen zu erhalten, können beispielsweise NMR-spektroskopische Untersuchungen und/ oder zeitaufgelöste IR-spektroskopische Untersuchungen kombiniert werden. Spezielle Fragestellungen bezüglich der Funktion bestimmter Aminosäuren können strukturell durch IR-Experimente mit Isotopen-markiertem bPAC adressiert werden.

Um allgemein die durch BLUF-Domänen ausgeübten Regulationsprinzipien und die Funktion der *Cap*-Helices besser zu verstehen, könnten Analysen an Hybridproteinen aus verschiedenen BLUF- und Effektordomänen herangezogen werden. Dabei kann die Korrelation zwischen Schnittstelle und Aktivitätsverhalten Auskunft über den für die BLUF-Signaltransduktion gemeinsamen und Rezeptor-spezifischen *Linker*-Bereich geben. Mit dem Ziel die Übertragbarkeit regulatorischer Prinzipien innerhalb der Photorezeptorfamilien zu prüfen, kann dieser Ansatz auch durch Einbeziehen von z.B. LOV-

Domänen erweitert werden.

Um insbesondere strukturelle Eigenschaften der BLUF-Domänen mit Funktionellen wie z.B. der Lebenszeit oder der Quantenausbeute des Signalzustandes in Bezug setzen zu können, sollten nPAC76 und nPAC35 in die Untersuchungen miteinbezogen werden: Die hohe Sequenzidentität von 79 % und ihr unterschiedliches kinetisches, sowie enzymatisches Verhalten machen sie zu geeigneten Kandidaten.

Den wahrscheinlich größten Fortschritt im Hinblick auf ein biophysikalisches Verständnis von bPAC würde die Aufklärung der Röntgenkristall-Struktur, möglichst im dunkel- und lichtadaptierten Zustand darstellen.

4 Material und Methoden

4.1 Mikrobiologische Methoden und Säugerzellkultur

4.1.1 Mikrobiologische Methoden

Kultivierung, Anzucht und Aufbewahrung von *E. coli*

Die *E. coli*-Stämme (siehe Tabelle 4.1) wurden sofern nicht anders vermerkt zur Selektion, zur Anzucht und zur Expression in flüssigem LB-Medium (1 % (alles in m/V) Bacto-Tryptone, 0.5 % Bacto-Yeast Extract, 1 % NaCl) oder auf LB-Agar (1.5% Agar in LB-Medium) unter Zusatz entsprechender Antibiotika (100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Ampicillin, 34 µg/ml Chloramphenicol, 50 µg/ml Streptomycin) kultiviert. Als Klonierungs- und Plasmidpräparationsstamm kamen DH10b-Zellen zum Einsatz; für die Proteinexpression wurde der Stamm BL21(DE3) verwendet.

Flüssigkulturen bis zu einem Volumen von 50 ml wurden mit einzelnen Kolonien von LB-Agar-Platten oder aus einer Stammkultur durch Anstechen mit einem sterilen Zahnstocher angeimpft. Flüssigkulturen von größerem Volumen wurden im Verhältnis 1:100 mit einer Übernacht-Vorkultur inokuliert. Die Anzucht erfolgte im Schüttler (Innova 4200, New Brunswick Scientific) bei 37 °C und 180 U/min über Nacht oder bis zu einer OD_{600nm} von 0.2-0.4. Zur Aufbewahrung eines Klons in Form einer Stammkultur wurden steriles Glycerin und Vorkultur im Verhältnis 1:1 gemischt und bei -80 °C gelagert.

Proteinexpression in *E. coli*

Für die Proteinexpression wurden 500 ml-Kulturen aus frisch transformierten Zellen und bei 30 °C zu einer optischen Dichte von OD_{600nm} ≈ 0.5 angezogen. Nach zweistündiger Abkühlung auf 18 °C erfolgte die Induktion der Expression durch Zugabe von 60 µM IPTG bzw. 200 µg/l Anhydrotetrazyklin (Endkonzentration). Die Zellen wurden nach 16-17 h geerntet (30 min, 4000 g, 4 °C, Avanti™ J-20 XP, Beckmann, Rotor JLA 8.1000) und das Zellpellet zügig in einem Verhältnis von 1.5 ml pro g Zellen Resuspensionspuffer (50 mM Na₂HPO₄ pH 7.5, 300 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM β-Mercaptoethanol,

4 Material und Methoden

1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, ein Tropfen Antischaum A und etwas DNase (beides Sigma)) resuspendiert. Die Zellen wurden nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert oder sofort weiterverarbeitet.

Herstellung CaCl_2 -kompetenter *E. coli*-Zellen

Kompetente Zellen wurden über Nacht in 50 ml SOB-Medium (2 % (m/V) Bacto-Tryptone, 0.5 % (m/V) Bacto-Yeast Extract, 10 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4 , 10 mM MgCl_2) kultiviert, und anschließend in 200 ml SOB-Medium auf eine $\text{OD}_{600\text{nm}} \approx 0.3\text{-}0.4$ angezogen. Die geernteten Zellen (7 min, 2400 U/min, 4°C , Megafuge 1.0 R mit Ausschwingrotor, Thermo) wurden in 15 ml TfbI-Puffer (30 mM Kaliumacetat, 50 mM MnCl, 100 mM KCl und 15 % (V/V) Glycerin, pH 5.8) resuspendiert und auf Eis inkubiert (DH10b-Zellen 10 min, BL21-Zellen 90 min). Durch erneutes Zentrifugieren (5 min, 2000 U/min, 4°C), Dekantieren und vorsichtiges Resuspendieren in 2 ml eiskaltem TfbII-Puffer (10 mM MOPS, 15 mM CaCl_2 , 10 mM KCl, 15 % (V/V) Glycerin, pH 7.0) erhielt man CaCl_2 -kompetente Zellen, die in Portionen zu je 110 μl bei -80°C aufbewahrt wurden.

Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Ausgehend von einer Stammkultur oder einer Kultur auf Agar-Platte wurde zunächst eine Übernacht-Vorkultur bereitet. 5 ml LB-Medium wurden mit 100 μl Vorkultur angeimpft und 3 Stunden bei 37°C und 200 U/min geschüttelt. Die Kultur wurde zu je 1.5 ml portioniert, die Zellen geerntet (11.000 U/min, 4°C , 30 s, Mikrozentrifuge MiniSpin[®], Eppendorf) und anschließend 3 mal mit 1 ml kaltem, sterilen 10 % (V/V)-Glycerin in bidestilliertem Wasser gewaschen. Die verbleibende Zellsuspension wurde direkt zur Transformation durch Elektroporation weiterverwendet bzw. bei -80°C gelagert.

Hitzeschock-Transformation

Für die CaCl_2 -Transformation wurden 50 μl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 30-100 ng DNA aus einer Plasmidpräparation oder 20 μl eines Ligationsansatzes gemischt und 10 min auf Eis gekühlt. Der Hitze-Schock erfolgte für 90 s bei 42°C in einem Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf) mit anschließendem Abkühlen auf Eis. Nach Zugabe von 500 μl LB-Medium ohne Antibiotikum wurde der Ansatz 1 h im Thermomixer bei 37°C und 600 U/min geschüttelt, 30 s bei 11.000 U/min abzentrifugiert und dekantiert. Im verbliebenen Überstand wurde das Zellpellet vorsichtig resuspendiert, auf einer LB-Agar-Platte mit Antibiotikum verteilt und für 16 h bei 37°C inkubiert.

Transformation durch Elektroporation

Zur Durchführung einer Elektroporation wurden maximal 20 ng Plasmid-DNA mit einem Aliquot elektrokompeter Zellen gemischt und 1 min auf Eis gelagert. Der Elektroschock erfolgte in einer gekühlten Elektroporationsküvette (Electroporation Cuvettes plus, 1 mm, BTX) mit einem Elektroporator (ElectroCellManipulator ECM 630, BTX) bei folgenden Geräteeinstellungen: Spannung 1500 V, Widerstand 125 Ω und Kapazität 50 μ F. Die Zellen wurden unmittelbar darauf in 500 μ l LB-Medium aufgenommen, für 1 h bei 37 °C und 650 U/min inkubiert und auf einer LB-Agar-Platte mit Antibiotikum angezogen.

Funktionstest auf MacConkey-Agar

Elektrokompente Zellen des Adenylatzyklase defizienten Stammes BTH101 wurden mit den Expressionskonstrukten für die vier kleinen PACs transformiert und auf LB-Agar selektiert. Positive Klone wurden in 5 ml Flüssigkultur bei 30 °C angezogen und PAC in Anwesenheit von 200 μ M IPTG 2 Stunden exprimiert. Anschließend wurden die Kulturen mit einer Impföse auf MacConkey-Agar (Difco, pH 7.5) mit 1 % Maltose aufgebracht und zum Sichtbarwerden der Färbung über Nacht im Dunkeln oder im Weisslicht (durchschnittliche Intensität 8 μ W mm⁻²) bei 30 °C inkubiert.

Übersicht über verwendete Vektoren und *E. coli*-Stämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp	Bezug
DH10b	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ - <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>nupG</i>	Invitrogen
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_Bm_B</i>) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3)	Novagen
BTH101	F ⁻ <i>cya-99</i> <i>ara</i> Δ 139 <i>galE</i> 15 <i>galK</i> 16 <i>rpsL</i> 1 (Str ^R) <i>hsdR2</i> <i>mcrA1</i> <i>mcrB1</i>	Euromedex

Abbildung 4.1: Verwendete *E. coli*-Stämme

Plasmid	Verwendung und Merkmale	Bezug
pET28a(+)	Expressionsvektor; kan ^R , T7-Promoter, lac-Operator, 6 x His-Tag(N), Protease Thrombin, T7-Tag(N)	Novagen
pETSUMO	Expressionsvektor; kan ^R , T7-Promoter, lac-Operator, 6 x His-Tag(N), SUMO-ORF, TA-Klonierungsstelle	Invitrogen
pASK43p	Expressionsvektor; amp ^R , tet-Promoter/ Operator, 6 x His-Tag(N), Strep-Tag (C)	IBA
pGEM-HE	Vektor für <i>in vitro</i> Transkription; Abkömmling des pGEM3Z-Vektors, modifiziert nach Liman <i>et al.</i> 1992; amp ^R , T7-Promoter, lac-Operator	Promega
pET28(a)-ec_bPAC	Ausgangsvektor für Konstrukte mit dem <i>E. coli</i> codon-adaptierten Gen	W. Gärtner, MPI Mühlheim
pGEM-HE-h_bPAC-cmyc	<i>in vitro</i> Transkription von human-codon-adaptierter bPAC-RNA	S. Tsunoda, HU Berlin
pGEM-HE-CNGA2-C460W-E583M	<i>in vitro</i> Transkription von CNG-Kanal RNA	W. Karpen, OHSU Portland

Abbildung 4.2: Verwendete Vektoren und Konstrukte

Nicht aufgeführte Konstrukte wurden aus den Ausgangsvektoren und synthetisch erworbenen Genen erhalten.

4.1.2 Zellbiologische Methoden

Auftauen und Einfrieren von *Chinese-Hamster-Ovary*-Zellen

Die cAMP-sensitive *CHO*-Reporterzelllinie [186] wurde von der Firma Bayer auf Trockeneis erhalten. Zum Auftauen wurden die Zellen im 37 °C warmen Wasserbad ange-taut und zügig in vorgewärmtes DMEM/F12 mit GlutaMAX (Gibco) und 20 % fötalem Kälberserum (Biochrom) überführt. Nach Entfernung des DMSO-haltigen Überstandes (3 min, 500 g) wurden die Zellen in 5 ml frischem Medium aufgenommen und in einer T25-Zellkulturflasche bis zur Konfluenz kultiviert. Für die Herstellung von Kulturen zur Dauerlagerung wurden 1-2·10⁶ Zellen in 2 ml DMEM/F12 mit 20% foetales Kälberserum und 10 % DMSO aufgenommen und in einem Kühlblock (Nalgene) bei -80 °C über 24 h eingefroren.

Kultivierung von *Chinese-Hamster-Ovary*-Zellen

Die Kultivierung der stabilen CHO-Zelllinie erfolgte adhärent in DMEM/F12 mit Gluta-MAX und 10% fötalem Kälberserum unter Zusatz der Antibiotika 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin, 0.25 mg/ml Zeocin und 0.6 mg/ml Hygromycin. Je 0.4·10⁶ Zel-len wurden auf 5 ml Kulturmedium in eine T25-Zellkulturflasche eingesät und im Brut-

schränk (Hera cell 240, Thermo) bei 37° C und unter 5 %-iger CO₂-Begasung bis zur Ansäuerung des Mediums angezogen. Um die Zellen zu prozessieren, wurde das überstehende Medium verworfen, die Zellen mit phosphatgepufferter Saline (PBS, Fa. Biochrom) gewaschen und durch Zugabe von 0.5 ml Trypsin (Biochrom) von der Flasche abgelöst. Nach Beendigung des Verdaus durch Zugabe von 2 ml FKS-haltigem Medium wurden die Zellen vereinzelt, ausgezählt und erneut eingesät.

Transfektion von *Chinese-Hamster-Ovary*-Zellen

Der Funktionstest in CHO-Zellen wurde unter Verwendung von C-terminal mit mCherry markiertem PAC in einem pEGFP-N1-Vektor (Clontech) durchgeführt. Vorbereitend für die Transfektion und die Ausführung des Funktionstests wurden je $1 \cdot 10^5$ Zellen in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (μ -clear plate black, Fa. Greiner) eingesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion durch Zugabe von 60 μ l Transfektionsmischung (7 μ l Fugene HD (Roche), 2 μ g DNA in 300 μ l Medium, bereitet nach Vorschrift) pro Vertiefung. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Transfektionsmedium entfernt, die Vertiefungen 3 mal mit PBS gewaschen und 3 h lang mit 5 μ g/ml Coelenterazine in Calcium-freier Tyrode-Lösung (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM Hepes, 1 mM MgCl₂, 4.8 mM NaHCO₃, pH 7.4) beladen. Unmittelbar vor Durchführung des Assays wurde Coelenterterazin-haltige Lösung durch Calcium-freie Tyrode ersetzt.

4.2 Molekularbiologische Methoden

Agarose-Gelelektrophorese

Analytische und präparative Trennungen von Nukleinsäuren erfolgten mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurden Agarose-Gele in entsprechenden Gelkammern durch Auflösen von 1% Agarose (Amresco) und 0.1 μ g/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer (40 mM Tris, pH 8.0, 0.11 % (V/V) Essigsäure 100 %, 1 mM EDTA) bereitet. Geltaschen wurden mit Proben (mind. 20 ng DNA in 1 x Orange Loading Dye, Fermentas) sowie DNA-Marker (GeneRulerTM 1kb DNA Ladder, Fermentas) beladen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 V ausgeführt (Standard Power Pack P25, Biometra®) und das Gel anschließend unter dem UV-Transilluminator (UV-System λ_{exc} =360 nm, CCD-Kamera 8 bit, Intas) ausgewertet bzw. mit einem Skalpell ausgeschnitten.

Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentration

Zur Überprüfung von Quantität und Qualität der DNA- und RNA-Präparationen wurde die Absorption einer 1:50 Verdünnung im Spektrometer (Ultrospec 1100pro, Amersham Biosciences) bei 260 nm bestimmt. Aus dem Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm wurde die Reinheit der Proben ermittelt.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte wurde unter Verwendung von synthetisch erstellten, flankierenden Primern (siehe Anhang 0.2) und einer modifizierten, fehlerkorrigierenden Polymerase (ReproFast-DNA Polymerase, Genaxxon) vorgenommen. 50 µl Ansatz beinhalteten 100 ng Template-DNA, 100 pmol je Primer, 1 x Pfu-Puffer, 200 µM je dNTP (Fermentas) und 2.5 U Polymerase. Die Reaktion wurde nach folgendem Protokoll in einem TGradient Thermocycler (Biometra®) ausgeführt:

1.	5 min	95 °C	initiale Denaturierung
2.	45 s	95 °C	Denaturierung
3.	45 s	55- 65 °C	Primeranlagerung, 5 °C unter T _M der Primer
4.	1 min je kbp	72 °C	Elongation
5.	4 min	72 °C	finale Elongation

Abbildung 4.3: Protokoll zum Amplifizieren von DNA-Fragmenten mittels PCR

Es wurden 30 Amplifikationszyklen (Schritte 2.-4.) ausgeführt.

Im Anschluss wurde das PCR-Produkt über eine Silikat-Säule (NucleoSpin® Extract II Kit, Macherey-Nagel) aufgereinigt und mittels Agarosegelelektrophorese auf seine Größe hin überprüft.

Aufreinigung von Plasmiden, PCR-Produkten und DNA-Fragmenten

Ausgangsmaterial für die Plasmidaufreinigung im analytischen Maßstab waren 5 ml einer Übernachtskultur. Nach dem Standardprotokoll zur Isolation von Plasmid-DNA mit dem NucleoSpin®Plasmid Kit (Macherey-Nagel) wurden geerntete Zellen durch SDS/ alkalische Lyse aufgeschlossen und über eine Silikat-Säule aufgereinigt. Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Lösung oder Agarose-Gelen erfolgte ebenfalls nach Standardprotokoll mithilfe des NucleoSpin® Extract II Kits (Macherey-Nagel). Die Endkonzentration an DNA wurde im Photometer (Spektrophotometer Ultrospec 500/ 1100 pro, Amersham Biosciences) bei 260 nm bestimmt.

Restriktionsverdau von DNA und Dephosphorylierung

Der Verdau von Plasmid-DNA oder PCR-Produkten wurde mithilfe von FastDigest-Restriktionsenzymen (Fermentas) vorgenommen. Je nach Bedarf wurden für einen analytischen oder präparativen Ansatz (20 bzw. 50 μ l Volumen) 1 bzw. 5 μ g DNA, 1 x FastDigest green Puffer und 1 bzw. 5 μ l Enzym 1 Stunde lang bei 37 °C verdaut. Zur Steigerung der Klonierungseffizienz wurden Religationen des Vektorfragmentes unterbunden, indem ausschließlich dephosphorylierte Vektor-DNA zum Ligieren verwendet wurde. Die Dephosphorylierung von 0.5 μ g verdaulichem Vektorfragment erfolgte in 50 μ l Ansätzen unter Verwendung der Antarktischen Phosphatase (NEB) in zugehörigem 1 x Phosphatase-Puffer. Spezifische DNA-Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese identifiziert, gegebenenfalls separiert und aufgereinigt.

Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation zweier DNA-Fragmente wurden in einem 20 μ l Ansatz 100 ng Vektorfragment, sowie Insert in einem molekularen Verhältnis von 1:5 eingesetzt und zusammen mit 5 U T4-Ligase (Fermentas) in 1 x T4-Ligase-Puffer 2 h bei 18 °C inkubiert.

Ortsgerichtete Mutagenese

Ortsspezifische Punktmutationen wurden in Genen mithilfe des QuickChange® II XL Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene) eingeführt. Dabei dienen synthetisch erstellte, komplementäre Primer, welche die gewünschte Mutation beinhalten (siehe Anhang 0.2), als Angriffstelle für die Amplifikation des Plasmids durch die PfuTurbo-Polymerase.

Für die Ausführung der Reaktion wurde ein 50 μ l Ansatz mit 5-50 ng Ausgangs-DNA, 10 pMol Primer, 1x Pfu-Puffer, je 200 μ M dNTP und 2.5 U Pfu-Polymerase (Stratagene) nach Herstellerangaben bereitet. Die Durchführung der Reaktion erfolgte im TGradient Thermocycler (Biometra®) unter Verwendung folgenden Programms:

1.	5 min	95 °C	initiale Denaturierung
2.	50 s	95 °C	Denaturierung
3.	45 s	55 °C	Primeranlagerung
4.	2 min je kbp	68 °C	Elongation
5.	7 min	68 °C	finale Elongation

Abbildung 4.4: Protokoll für QuickChange-Mutagenese

Es wurden 18 Amplifikationszyklen (Schritte 2.-4.) ausgeführt.

4 Material und Methoden

Nach anschließendem Verdau der Ausgangs-DNA durch Zugabe von 10 U des methylierungsspezifischen Restriktionsenzym DpnI (1 h bei 37 °C) waren 5 µl des Ansatzes für die Transformation von *E. coli* erforderlich. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch den Sequenzierungsservice ABI BigDye-Terminator-Chemie (Molekulare Biologie, HU-Berlin) bestätigt.

Linearisierung von Plasmiden

Für die Erzeugung von mRNA wurden zunächst die entsprechenden DNA-Sequenzen in einen pGEM-Vektor mit T7-Promoter und C-terminaler poly-A-Sequenz umklontiert. Anschließend wurden 9 µg Plasmid-DNA durch Zugabe von 50 U *NheI*-Restriktionsenzym verdaut und aufgereinigt. Zur Vermeidung von Ribonuklease-Kontamination wurde ausschließlich unter Ribonuklease-freien Bedingungen gearbeitet (Multiguard Barrier Tips, SorensonTM, RNase Away[®], Roth).

mRNA-Synthese und Präparation

Für die Herstellung von mRNA aus gereinigter und linearisierter Ausgangs-DNA wurde nach Vorgaben des mMESSEGEEmACHINE[®] T7 Ultra Kits (Ambion) folgender 20 µl-Transkriptionsansatz pipettiert: 1 µg linearisierte DNA, 10 µl T7 2 x NTP/ARCA, 2 µl 10 x T7 Reaktionspuffer und 2 µl T7 Enzymmix in nukleasefreiem Wasser. Nach Inkubation (2 Stunden bei 37 °C) wurde durch Zugabe von 50 µl LiCl-Lösung die mRNA für mindestens 30 min bei -20 °C präzipitiert und durch Zentrifugation (16.000 g bei 4 °C) pelletiert. Zwecks Entfernung restlicher Proteine und Nukleotide schloss sich ein Waschschriff mit 1 ml 70 % (V/V) Ethanol an. Schließlich wurde das getrocknete RNA-Pellet in 20 µl nukleasefreiem Wasser (Ambion) gelöst und im Photospektrometer bei 260 nm quantifiziert. Die RNA konnte bis zur Injektion bei -80 °C aufbewahrt werden. Die Überprüfung der RNA-Qualität erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese nach Denaturieren (75 °C, 10 min). Für die Herstellung der RNA wurden generell Human-codon adaptierte Gene verwendet.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

Zellaufschluss von *E. coli* und Präparation des löslichen Überstandes

Der Zellaufschluss von *E. coli* zum Zweck der Proteinpräparation erfolgte nach mechanischem Prinzip mit Hilfe eines Mikro-Fluidizers (EF-C3 EmulsiFlex, Avestin Europe GmbH). Zellen wurden pro g Gewicht in 1.5 ml Resuspensionspuffer (50 mM Na₂HPO₄

pH 7.5, 300 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, ein Tropfen Antischaum A und etwas DNase) suspendiert und unter Anwendung eines Druckes von 1200-1500 bar und bei 4 °C in einem Durchlauf homogenisiert. Im Anschluss wurden unlösliche Bestandteile durch Ultrazentrifugation (1 h, 4 °C, 40.000 U/min, Sorvall[®], DiscoveryTM 90SE, Hitachi, Rotor TFT 45.50) abgetrennt.

Proteinreinigung mittels Affinitätschromatografie

Die native Aufreinigung der SUMO-PAC-Konstrukte wurde aus dem löslichen Überstand durch 1 ml Co-NTA-Resin (Talon Superflow, Clontech) in einer Plasiksäule mit Fritte (Sigma) nach Herstellervorschrift bei pH 7.5 vorgenommen. Die Fließgeschwindigkeit betrug konstant 1 ml/min und wurde durch eine Schlauch-Pumpe (Reglo analog, Ismatec) gesteuert. Die Kontrolle der Proteinelution erfolgte über die Absorption bei 278 nm mittels eines Durchflussphotometers (Uvicord-II, LKB Bromma) in Verbindung mit einem Schreiber (L250E, Knauer). Im Anschluss wurde das Eluat 2x gegen 1 l imidazolfreien Puffer (50 mM Na₂HPO₄ pH 7.5, 300 mM NaCl, 5 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, Dialysemembran MWCO 12.4 kDa, Sigma) dialysiert und mittels Amicon[®]-Konzentratoren (Amicon Ultra-15 MWCO 10.000 Da, Millipore) auf eine OD_{450nm} von mindestens 0.2 aufkonzentriert (Megafuge, Rotor mit Ausschwingarm, 4 °C, 4000 g). Das präparierte Protein wurde in einer SDS-PAGE auf Reinheit überprüft und direkt zur Analyse verwendet bzw. in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Präparation von bPAC aus dem Chaperon-enthaltenden Stamm erfolgte auf gleiche Weise, jedoch unter Verwendung von 2 ml Ni-NTA (Ni-NTA Superflow, Qiagen) und des entsprechenden Qiagen Protokolls. Letztlich wurde das Protein durch Dialyse in einen HEPES-basierten Puffer (25 mM HEPES, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 2.5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 2 mM DTE und 10 % Glycerin) überführt.

Proteinauftrennung mittels Größenausschluss-Chromatografie

Zur Beurteilung der Homogenität und des oligomeren Zustandes einer Proteinpräparation kam analytische Größenausschluss-Chromatographie zum Einsatz. Vorbereitend wurden alle Puffer und Lösungen filtriert (0.45 μ m Membranen) und unter Rühren entgast (Membranpumpe MZ 2C, Vacuubrand). Zur Auftrennung von Proteinen im Bereich von 30-100 kDa kam eine Superose 6 10/300 GL Säule (GE Healthcare) zum Einsatz, die mittels eines Äkta Prime Chromatografie-Systems (GE Healthcare) betrieben und über die Software (PrimeView, GE Healthcare) gesteuert wurde. Für die Auftrennung von bPAC wurde die Säule mit dem HEPES-basierten Puffer bei einer Flussgeschwin-

4 Material und Methoden

dikeit von 0.3 ml pro Minute equilibriert und anschließend je 300 μ l einer Proteinprobe ($OD_{450nm} \approx 0.5$) und verschiedene Standards (Rinderserumalbumin, Ovalbumin, α -Amylase und Lysozym, Sigma) aufgetragen. Die Größenausschlusschromatographie an nPAC76 wurde in 10 mM Natriumphosphat, 10 mM Natriumchlorid bei pH 7.5 durchgeführt. Für die Analyse wurden die Chromatogramme in Origin 8.1 (OriginLab Corporation) Hintergrund-korrigiert.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Identität und Reiheit von präpariertem Protein wurde durch denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf Polyacrylamid-Gelen überprüft, die aus einem 3 %-igen Sammel- und einem 12 %-igen Trenngel nach Laemmli bereitet waren [81].

Zur Durchführung der Elektrophorese wurden 10 μ l einer Probe mit 2.5 μ l 4-fach verdünntem SDS-Probenpuffer (65 mM Tris, 3 % (m/V) SDS, 0.1 % (m/V) Bromphenolblau, 30 % (V/V) Glycerol, 5 % (V/V) β -Mercaptoethanol, pH 6.8) bei 95 °C (10 min und 1400 U/min) denaturiert und nebst 7 μ l Marker (PAGE-Ruler prestained protein ladder, Fermentas) aufgetragen. Die Trennung erfolgte unter Anlegen eines konstanten Stromes von 30 mA (Standard Power Pack P25, Biometra®). Zum Färben der Proteinbanden wurde das Gel 3 min in Coomassie-Färbelösung (0.05 % Serva Blue G, 25 % Isopropanol 100 %, 10 % Essigsäure 100 %) aufgekocht. Das Entfärben erfolgte durch mehrfaches Aufkochen in Wasser.

Zellaufschluss und Präparation von *Xenopus laevis*-Oozyten

Der Nachweis der Proteinexpression in *Xenopus laevis*-Oozyten wurde durch SDS-PAGE und Western Blot Analyse einzelner Oozyten im Anschluss an die elektrophysiologischen Messungen erbracht. Oozyten wurden je in 50 μ l HbA-Puffer (20 mM Tris, pH 7.6, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM Na_2HPO_4 , 1 mM EDTA, 80 mM Sucrose, 0.1 mM PMSF) durch Pipettieren homogenisiert, in mehreren Zentrifugationsschritten (200 g, 10 min, 4 °C) von unlöslichen Hüll-Proteinen und ggf. von der Membran (16000 g, 4 °C) getrennt. Der lösliche Überstand wurde mit Probenpuffer versetzt und direkt für die SDS-PAGE eingesetzt.

Western Blot

Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte mittels eines Immunoblots unter Verwendung des N-terminalen His-Affinitätsmarkers oder eines C-terminal klonierten Myc-Affinitätsmarkers. Dazu wurden Blot-Membranen (Immobilon-P, PVDF, 0.45 μ m, Millipore) und SDS-PAGE Gele in Puffer (50 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (V/V) Methanol,

pH 8.3) getränkt, in eine Semi-dry Blot-Apparatur (Blue-flash, Serva) geschichtet, und die Proteine bei 45 min 15 V transferiert. Im Anschluss wurde die Membran mit 5 % Milchpulver in 0.1 % Tween-PBS blockiert, mindestens eine Stunde mit einer 1:2000 Verdünnung des primären Antikörpers in Tween-PBS mit 0.5 % Milchpulver geschwenkt (Tabelle 4.5, 50 U/min, Raumtemperatur) und für 3 x 10 min mit Tween-PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte für 1 h in einer Verdünnung 1:4000 in Tween-PBS mit 0.5 % Milchpulver. Die Färbung erfolgte nach erneutem Waschen in 10 ml Detektionspuffer (100 mM Tris, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) unter Zugabe von 8 µl NTB (53 mg/ml in 70 % (V/V) DMF) und 30 µl BCIP (50 mg/ml in DMF).

Antikörper	Organismus	Bezug
Anti-His-tag Antikörper	Maus	Calbiochem
Anti-Myc-tag Antikörper	Kaninchen	Sigma
sekundärer Anti-Maus-IgG	Ziege	Sigma
Antikörper mit alkalischer Phosphatase		
sekundärer Anti-Kaninchen-IgG	Ziege	Sigma
Antikörper mit alkalischer Phosphatase		

Abbildung 4.5: Antikörper für Immunoblotting

***in vitro*-Test für Adenylatzyklaseaktivität**

Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität kleiner PACs *in vitro* wurden in geschwärzten Reaktionsgefäßen (Rotilabo Reaktionsgefäße schwarz, Roth) 500 µl Ansätze aus *Assay*-Puffer (50 mM Natriumphosphat, 2 mM Magnesiumchlorid, 10 % Glycerin, pH 8) und 100 µM ATP (Fermentas) bereitet und auf 21 °C im Thermomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf) temperiert. Die Reaktion wurde standardmäßig durch Zugabe von 0.19 µM Protein gestartet, 1 min im Dunkeln gehalten oder mit einer blauen LED (Luxeon Star O, 456 nm), LuxeonTM Star, effektive Intensität: 1.7 mW·mm⁻²) beleuchtet und unmittelbar darauf bei 95 °C für 10 min gestoppt. Aktivitätsreihen, sowie die Bestimmung der Dunkel- und Lichtaktivität wurden aus einem gemeinsamen Ansatz entnommen und parallel weiterbehandelt. Zur Kontrollzwecken wurde vor jeder Messung die ATP-Konzentration aus einem Leerwert ohne Protein bestimmt. Die Durchführung aller Assays erfolgte unter schwachem Rotlicht. Im Anschluss erfolgte die Probenvorbereitung für die HPLC-Analyse. Die Proben wurden bei -20 °C eingefroren oder direkt ausgewertet.

HPLC-basierte Nukleotidanalyse

Die Quantifizierung der Nukleotide aus dem *in vitro*-Test erfolgte isokratisch durch eine C18-Säule mit revertierter Phase (Supelcosil LC-18-T, 150 x 4.6 mm, 3 μ m Porengröße, Supelco), die an ein modulares HPLC-System (Smartline Autosampler 3600, WellChrom Degasser K-5004, WellChrom Solvent Organizer K-1500, WellChrom HPLC-Pumpe K-1001, WellChrom Spektralphotometer K-2600, Fa. Knauer) angeschlossen ist und durch die Software ClarityChrom V2.6.5 (Knauer) gesteuert wird. ATP und cAMP wurden über ihre Absorption bei 253 nm quantifiziert. Die Probenvorbereitung bestand aus einer Zentrifugation (10 min, 4 °C, 16000 g) und einer Filtrierung (Acrodisc 13 mm, 0.2 μ m Nylon, Life Sciences) der hitzeinaktivierten Proben (10 min, 95 °C). Je 50 μ l einer Probe oder eines Standards wurden auf die equilibrierte Säule (Puffer: 100 mM Kaliumphosphat, 4 mM Tetrabutylammoniumchlorid, 10 % Methanol, pH 5.9) bei einer Flussgeschwindigkeit von 0.7 ml/min aufgetragen.

HPLC-basierte Kofaktoranalyse

Die Flavinzusammensetzung von nPAC76 wurde ebenfalls unter Anwendung eines isokratischen Protokolls (Fluss: 630 μ l/min, Puffer: 10 mM NH₄Acetatlösung pH 6.0, davon 53 % (V/V) in Acetonitril) an einer C18-Umkehrphasen-Säule (C18-Prontosil, 250 x 4.6 mm, 4 μ m Porengröße, Bischoff Chromatografie) bestimmt. Vorbereitend wurden 500 μ l einer Proteinprobe ($OD_{450nm} \approx 0.3$) 3 min bei 95 °C denaturiert, zentrifugiert (2 min, 16.000 g, 4 °C) und filtriert (3 N Syringe Filter 0.45 Micron (Porendurchmesser 0.45 μ m), Nylon, 3 mm, Cameo). Für die Analyse wurden 60 μ l Probe oder Flavinstandard aufgetragen. Die Detektion erfolgte bei 260 nm.

4.4 Spektroskopie

UV/vis-Absorptionsspektroskopie

UV/vis-Spektren dunkeladaptierter PACs und kinetische Messungen bei fester Wellenlänge wurden in dem Spektrophotometer Cary 300 Bio (Varian) aufgenommen. Die Messungen der Spektren erfolgten in Quarzküvetten (10 mm Schichtdicke, Material Quarz Q, Starna GmbH) bei 20 °C mit den Einstellungen: spektrale Bandbreite 2 nm, Integrationszeit $\Delta t = 0.1$ s und spektrale Auflösung $\Delta \lambda = 1$ nm. Die Zerfallskinetik des rotverschobenen Zustandes wurde bei $\lambda = 489$ nm mit den Einstellungen Integrationszeit $\Delta t = 0.03$ s und spektrale Bandbreite 4 nm vorgenommen. Die Anregung erfolgte durch eine blaue LED (Luxeon Star O (456 nm), LuxeonTM Star, effektive Leistung 90 mW/cm²). Die

Zeitkonstante des Zerfalls wurde anhand eines exponentiellen Fits durch die Software Origin 8.1G (OriginLab) bestimmt.

UV/vis-Spektren lichtadaptierter PACs, sowie deren Zerfallskinetik wurden durch Herrn Dr. Hagedorn an einem Blitzlicht-Photolyse-Setup bestehend aus Xenon-Lampe (XBO 75W), Lichtleiter, Shamrock303i Spektrograph und einer Andor iStar ICCD Kamera (Andor Technology, Belfast) gemessen. Die Aufnahme der lichtadaptierten Spektren startete nach einem 500 ms LED-Lichtblitz und erfolgte mit einer 100 ms Zeitauflösung über einen Zeitraum von 1.2 s. Das Messlicht war zuvor durch Verwendung eines Shutters (Uniblitz, San Francisco) soweit reduziert worden, dass keine nennenswerte Anregung des Grundzustandes erfolgte. Je 10 Spektren wurden gemittelt, geglättet und im zeitlichen Verlauf als Licht-minus-Dunkel-Differenzspektren dargestellt.

Lumineszenz-Messungen an *CHO*-Zellen

Die Aufnahme der Aequorin-Lumineszenz im Rahmen des Funktionsassays an *CHO*-Zellen erfolgte an einem Mikroplatten-Lesegerät Infinite M200 Pro (Tecan), das von Prof. Möglich (AG Biophysikalische Chemie, HU Berlin) bereitgestellt wurde. Für eine Messabfolge wurde im automatischen Lumineszenz-Modus (Integrationszeit $\Delta t = 1000$ ms, Aufnahme-Intervall 2100 ms) zunächst der Lumineszenz-Hintergrund bestimmt. Nach PAC-Aktivierung wurde die Reaktion durch automatisierte Injektion von 3 mM CaCl_2 gestartet und der Lumineszenz-Verlauf 2 Minuten lang verfolgt. Die Anregung der PAC wurde dabei manuell durchgeführt, indem einzelne Vertiefungen der ausgefahrenen Platte mit einer LED (Luxeon Star O, 456 nm, LuxeonTM Star) belichtet wurden.

Fourier-Transform-Infrarot-(FTIR)-Spektroskopie

Steady-state FTIR-Spektroskopie an bPAC und bPAC-BLUF wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Tilo Mathes und Prof. John Kennis im LaserLab der VU Amsterdam durchgeführt. Das experimentelle Setup bestand aus einem Bruker IFSv66 *step-scan/rapid-scan* FTIR Spektrometer (spektrale Auflösung 3 cm^{-1}) in Verbindung mit einem Stickstoffgekühlten photovoltaischen Quecksilber-Cadmium-Tellurid-Detektor (20 MHz, KV 100, Kolmar Technologies, Newburyport, MA). Die Anregung der Probe während der Aufnahme lichtadaptierter Spektren erfolgte für 30 s durch eine 460 nm LED.

Vor den Messungen wurden Proteinproben auf eine $\text{OD}_{450\text{nm}} \approx 100$ aufkonzentriert und in dünner Schicht auf eine Calciumfluorid-Messzelle aufgebracht, sodass sie eine $\text{OD}_{1600/\text{cm}}$ von 0.6-0.9 aufwiesen. Die gefüllte Messzelle wurden bis zum vollständigen Verflüchtigen des umgebenden Wasserdampfes im Gerät equilibriert. Vor jeder Aufnahme wurden zunächst Hintergrundmessungen unter den jeweiligen Lichtverhältnissen durchgeführt. Die

Aufnahmen der Spektren erfolgten im Dunkel oder unter LED-Beleuchtung, indem je 100 Scans gemittelt wurden. Licht-Dunkel-Differenzspektren wurden aus 10 gemittelten, Hintergrund-korrigierten Licht- und Dunkelspektren erhalten.

4.5 Elektrophysiologische Methoden

Präparation und Injektion von *Xenopus laevis*-Oozyten

In Vorbereitung auf den elektrophysiologischen Funktionstest wurden frisch entnommene Oozyten präpariert, indem Bindegewebe und Epithelzellen 2 h im Inkubator (200 U/min, 18 °C) in 20 ml ORI-Puffer (96 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM MOPS, pH 7.5) plus 4 mg Kollagenase IA (Sigma) abgedaut wurden. Ausgewählte Oozyten der Reifungsstadien IV bis VI wurden in Messpuffer (ORI plus 2 mM CaCl₂) mit 0.05 mg/ml Streptomycin und 50 U/l Penicillin (Penicillin-Streptomycin-Solution, Sigma) bis zur Injektion am folgenden Tag bei 18 °C und 70 U/min aufbewahrt (Inkubator M-153, Sanjo). Die Injektionsnadeln wurden mit einem Mikropipetten Puller (P-97, Sutter Instruments) aus Glaskapillaren (Glass Replacement 3.5 nl, Ø 0.5 mm, OD = 1.14 mm, World Precision Instruments) so gefertigt, dass sie ein Innenvolumen von ca. 5 µl und einen Spitzen-Durchmesser von 10-30 µm aufwiesen. Mit Hilfe eines Mikroinjektors (Nanoliter 2000, World Precision Instruments) wurden 37.5 nl RNA-Lösung luftblasenfrei in die weiße, vegetative Seite einer Zelle injiziert. Die Injektionslösung wurde aus PAC- und CNG-A2-RNA so bereitet, dass im jeweiligen Mischungsverhältnis pro Zelle 20 ng Kanal-RNA enthalten waren. Bis zur Messung wurden die Zellen in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen und frischem Messpuffer bei 18 °C und 70 U/min inkubiert.

Two-Electrode-Voltage-Clamp-Messungen

Die elektrophysiologischen Experimente an *Xenopus*-Oozyten wurden von Frau Mail Reh ausgeführt. Zur Messung photoinduzierter Membranströme wurde ein *Two-Electrode-Voltage-Clamp* Aufbau aus folgenden Komponenten genutzt: Elektroden (Strom-, Potenzial-, Referenz-, und Badelektrode) wurden zunächst aus Borosilikatglaskapillaren GC-150 TF-7.5, OD = 1.5 mm, Ø 1.17 mm (Clark Elektromedical Instruments) mit dem Mikropipetten Puller gezogen und mit chlorierten Silberdrähten Ag-10T, Ag-25T (Science Products), sowie einer Agar-Brücke versehen. Die *voltage-clamp* Messung wurde durch einen Verstärker Turbo TeC-03X (npi) mit Digital-Analog-Wandler Digidata 1322A (Axon Instruments) realisiert. Als Lichtquelle diente eine Xenonlampe U-ULS75XE (Olympus optical) in Verbindung mit einem Shutter (Uniblitz LS6 ZM2, Vincent Associates), einem 450 nm Farbbinterferenzfilter (Balzers Liechtenstein) und einem Lichtlei-

terkabel (\varnothing 3.0 mm, Laser Components GmbH, Olching). Die effektive Lichtintensität betrug 7.6 W/cm^2 . Die Ansteuerung aller technischen Komponenten, sowie die Aufnahme wurde durch die Software pClamp 9 (Axon Instruments) vorgenommen.

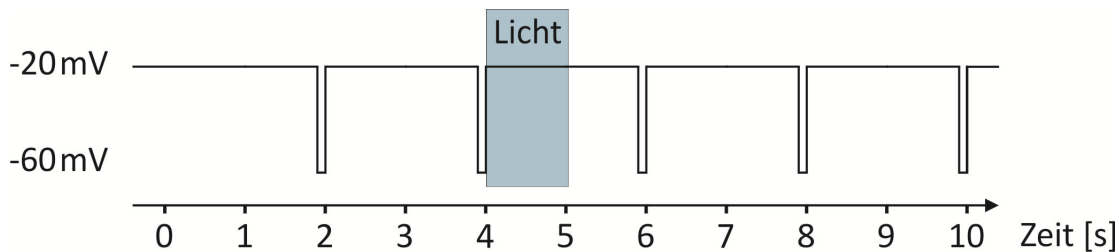


Abbildung 4.6: Darstellung einer Spannungs- und Beleuchtungsabfolge zur Aufnahme von Photoströmen

Die Messungen selbst wurden im Modus der Spannungsklemme durchgeführt. Um die Belastungen durch den Kationeneinstrom für die Zelle gering zu halten, wurden bei einem konstanten Haltepotenzial von -20 mV die Leitfähigkeit der Membran durch 100 ms lange Messpulse bei Spannungen zwischen -40 und -60 mV abgefragt (siehe Abb. 4.6). Die Ruheintervalle wurden der gewünschten Auflösung angepasst. Für die Auswertung wurde die Software Clampfit (Axon Instruments) verwendet. Zur Darstellung von Kurvenschaaren wurden Ströme Basislinien-korrigiert. Grafiken wurden mithilfe von Origin 8.1 (OriginLab Corporation) erstellt.

4.6 Bioinformatik

Erstellung von berechneten Protein-Strukturen

Die Berechnung von Proteinstrukturen auf Grundlage von Homologie-Modelling wurde am Swiss Institute of Bioinformatics mithilfe des SwissModel Workspace (<http://swissmodel.expasy.org/>) durchgeführt [3, 46, 148]. Dazu wurde nach Vorgabe der Aminosäuren-Sequenz im automatischen Modus eine geeignete Struktur ausgewählt, homologe Bereiche ausgerichtet und zur Erstellung an den SwissModel-Server übersendet. Berechnete Strukturen wurden mit PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 (Schrödinger, LLC, <http://www.pymol.org>) dargestellt [146].

Verwaltung von DNA- und Aminosäure-Sequenzen

Die Verwaltung und Erstellung von Plasmidkarten, Primer-Design und virtuelle Klonierungen wurden mit der Software GENtle (<http://gentle.magnusmanske.de/>) vorgenommen. Multiple Aminosäuren-*Alignments* wurden mithilfe des Tcoffee-Servers erstellt (<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/index.html>) und mit BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) angezeigt.

Anhang

0.1 Abkürzungen

AC	Adenylatzyklase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>Arbitrary Units</i>
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat
c-di-GMP	zyklisches di-Guanosinmonophosphat
CNG	<i>Cyclic Nucleotid Gated</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAD	Flavin Adenin Dinukleotid
FKS	Fötales Kälber Serum
FMN	Flavin Mono Nukleotid
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
g	Erdbeschleunigung
GPCR	<i>G-Protein Coupled Receptor</i>
HPLC	High-Pressure-Liquid-Chromatographie
IR	Infrarot
I_{exc}	Anregungsintensität
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
λ_{exc}	Anregungswellenlänge
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
M	Molar [mol/l]

Anhang

MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-tri-acetat
OD	Optische Dichte
PAC	Photoaktivierte Adenylatzyklase
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDE	Phosphodiesterase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RF	Riboflavin
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEVC	<i>Two-Electrode-Voltage-Clamp</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
RLU	<i>Relative Light Unit</i>
UV	Ultraviolett
vis	visuell
V_{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit [mol cAMP · min ⁻¹ · mg ⁻¹]
WT	Wildtyp

0.2 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Reinheit
ecBgPAC-SUMO-fw	AAAGGATCCCATATGATGAAACGCCTGGTG	entsalzt
ecBgPAC-SUMO-rev	GTGCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTTATTA	entsalzt
ecBgBLUF-K124-Cterm-HindIII-rv	TTTTTTAAGCTTCTATTTTCCAGCACACGATGGCTCTGG	entsalzt
BgBLUF-N-term-NdeI-2	GGTATTGGATCCCATATGATGAAACGCCTGGTGTATATTAGC	entsalzt

Abbildung 7: Flankierende Primer zum Amplifizieren spezifischer DNA-Abschnitte

Die Primer ecBgPAC-SUMO-fw und ecBgPAC-SUMO-rev wurden zum Klonieren des *E. coli* adaptierten bPAC-Gens aus pET28 in pETSUMO, die Primer BgBLUF-N-term-NdeI-2 und ecBgBLUF-K124-Cterm-HindIII-rv wurden zum Klonieren der bPAC-BLUF-Domäne in pET28 verwendet.

Bezeichnung	Sequenz	Reinheit
bPAC-Y7F_fw	GATGAAACGCCTGGTGT T TATTAGCAAAATTAGCGGC	HPLC
bPAC-Y7F_rv	GCCGCTAATTTTGCTAATA A ACACCAGGCGTTTCATC	HPLC
bPAC-S27A_fw	CAGCGTATTGGCAAAGT G GCATCAAAAACAACCAGCGC	HPLC
bPAC-S27A_rv	GCGCTGGTTGTTTTGAT G CCACTTGCCAATACGCTG	HPLC
bPAC-N30E_fw	GGCAAAGTGAGCATCAA G AAACACGCGCGATAACATTAC	HPLC
bPAC-N30E_rv	GTAATGTTATCGCGCTGGTT T CTTTGATGCTCACTTTGCC	HPLC
bPAC-Q49A_fw	CTGCAGGGCCTGTTTT T GCGATTCTGGAAGGCGAAAACG	HPLC
bPAC-Q49A_rv	CGTTTTGCCTTCCAGAAT C GAAAAACAGGCCCTGCAG	HPLC
bPAC-L61F_fw	CGAAAAAGTGATAA T CTATAAAAAATCCTGGTGG	HPLC
bPAC-L61F_rv	CCACCAGGATTTTTTAT A GAATTATCCACTTTTCG	HPLC
bPACW90A_fw	GATCGCATGTTTCCGAAC G CGGCCATGAAAACCATTAAC	HPLC
bPACW90A_rv	GTTAATGGTTTTCATGGCC G CGTTCGGAACATGCGATC	HPLC
bPAC-W90F_fw	CGATCGCATGTTTCCGA A CTCGCCATGAAAACCATTAACC	HPLC
bPAC-W90F_rv	GGTTAATGGTTTTCATGGC A AGTTCGGAACATGCGATCG	HPLC
bPAC-M93A_fw	CATGTTTCCGA A CTGGGCCGCGAAAACCATTAACCTG	HPLC
bPAC-M93A_rv	CAGGTTAATGGTTTT C GCGGCCAGTTCGGAACATG	HPLC

Abbildung 8: Primer für die ortsspezifische Mutagenese von bPAC
Fehlgepaarte Nukleotide sind fett gedruckt.

0.3 Spektroskopische Charakterisierung von bPAC-Y7F

Mit dem Ziel, das photochemische Verhalten von bPAC-Y7F genauer zu charakterisieren, führte Prof. Penzkofer (Universität Regensburg) die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen durch und entwickelte daraus ein Photozyklusmodell. Dabei wurden folgende Befunde berücksichtigt: (1.) Belichtet man dunkeladaptiertes bPAC-Y7F_d bis zu einer Minute, wird eine zusätzlich, schwache Bande bei 680 nm im Spektrum sichtbar (Abbildung 9). (2.) Belichtung, die länger als 3 min andauert, führt zur Ausbildung einer weiteren Bande um 340 nm und zur Aufhebung des isosbestischen Punktes bei 346 nm. (3.) Ein vollständiges Bleichen der Absorption bei 440 nm wird auch nach 15 min Belichtung nicht erreicht. (4.) Die Absorptionsrückbildung bei 590 nm folgt einer monoexpo-

nentiellen Kinetik und kann dem Zerfall des neutralen Semichinons mit $\tau_{FLH} = 40.4$ min zugeordnet werden (Abb. 9). (5.) Die Rückkehr der Absorption bei 440 nm ist biexponentiell ($\tau_{rec,1} = 5.9$ min, Amplitude₁: 34 % und $\tau_{rec,2} = 40.4$ min, Amplitude₂: 66 %), was die Beteiligung einer weiteren Spezies vermuten lässt. Die ursprüngliche Absorption bei 440 nm wird aber nur zu 60 % wiederhergestellt (Abb. 9). Auch ein Rückgang der Absorption bei 680 nm erfolgt nicht. Die beschriebenen Änderungen werden von einem dauerhaften Rückgang der Fluoreszenz begleitet; dies spricht für die Ausbildung langlebiger Spezies mit anderen Emissionseigenschaften (nicht gezeigt).

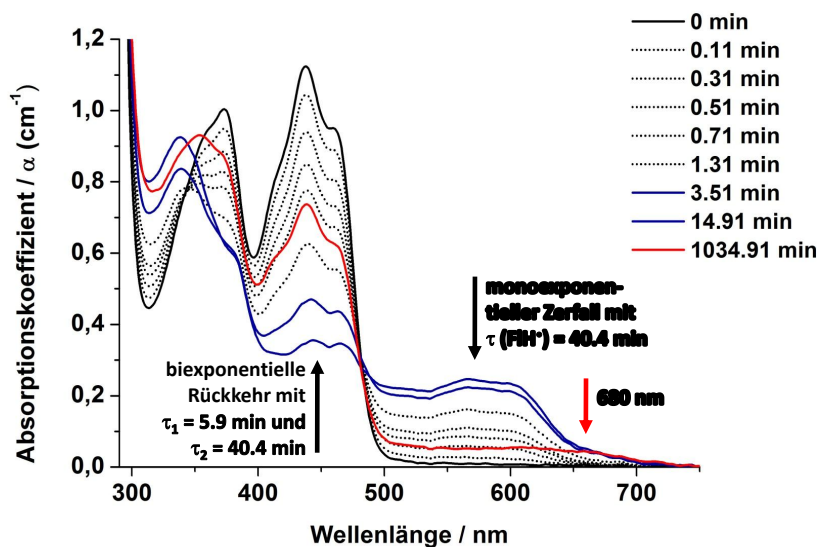


Abbildung 9: Absorptionsverhalten von bPAC-Y7F nach Prof. A. Penzkofer

Entwicklung des Absorptionsspektren von bPAC-Y7F unter Dauerbelichtung. Die Anregung erfolgte mittels LED (455 nm, $I = 0.00667 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$) über einen Zeitraum bis zu 15 min (siehe Legende). Bei einer Belichtung bis ca. einer Minute (schwarze Spektren) dominiert die Bildung von neutralem Semichinon. Ein Fortsetzen der Anregung führt zu einem Anstieg der Absorption bei 340 nm und 680 nm (blaue Kurven). Nach mehr als 6 Stunden Dunkelheit erreicht die Absorption bei 440 nm nur 60 % des ursprünglichen Wertes. Die Kurvenanpassung der Absorptionrückkehr bei $\lambda_{440 \text{ nm}}$ und $\lambda_{590 \text{ nm}}$ ergibt eine biexponentielle Rückkehr mit den Zeitkonstanten $\tau_{rec,1} = 5.9$ min und $\tau_{rec,2} = 40.4$ min bei $\lambda_{440 \text{ nm}}$ und eine monoexponentielle Rückkehr mit $\tau_{rec} = 40.4$ min bei $\lambda_{590 \text{ nm}}$.

Um diese komplexen Befunde von bPAC-Y7F zu beschreiben, wurde ein Modell angenommen, in dem das neutrale Semichinon FLH^{\cdot} durch eine lichtinduzierte Protonierungsreaktion aus dem anionischen Semichinon $Fl^{\cdot-}$ hervorgeht; dieser Vorgang konkurriert mit der irreversiblen Bildung eines chinoiden Semichinons $FlQH^{\cdot}$ (Abb. 10 A und Abb. 11). Nach diesem Modell reagiert der größte Teil des angeregten Flavins innerhalb von wenigen Nanosekunden zurück in den Grundzustand (96.4 %). Das primäre

Anionradikal $Fl^{\cdot-}$ bildet sich mit einer Quantenausbeute von $\phi_{Fl^{\cdot-}} = 0.036$ und besitzt eine Lebenszeit von $\tau_{Fl^{\cdot-}} = 5.9$ min. Die Quantenausbeute wurde aus dem Verhältnis der Anzahl gebildeter Radikal-Moleküle und der Anzahl absorbierten Photonen berechnet; dazu wurden die Änderung des Absorptionskoeffizienten bei 440 nm, der entsprechende Absorptionsquerschnitt und der Absorptionskoeffizient bei der Anregungswellenlänge 455 nm aus Abb. 9 entnommen.

Ein weiterer Absorptionsschritt initiiert die Protonierung des Semichinons mit einer Quantenausbeute von $\phi_{FlH^{\cdot}} = 0.01$ oder die irreversible Ausbildung der chinoiden Semichinonform mit $\phi_{FlQH^{\cdot}} = 0.007$. Bezogen auf das anionische Semichinon ergibt sich für das neutrale Semichinon eine relative Quantenausbeute von $\phi_{rel,FlH^{\cdot}} = 0.31$, für das chinoides Semichinon eine relative Quantenausbeute von $\phi_{rel,FlQH^{\cdot}} = 0.2$.

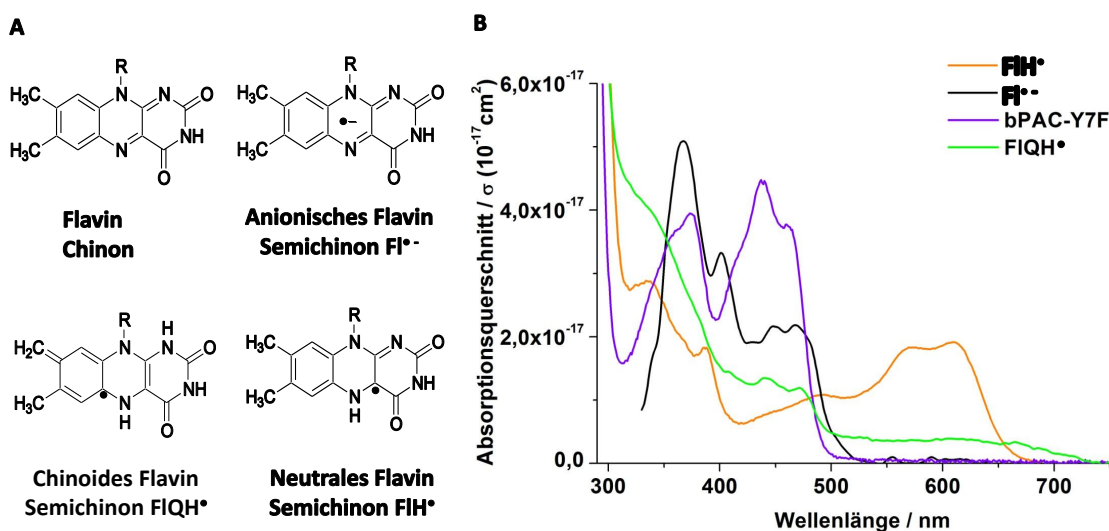


Abbildung 10: Strukturformeln und Absorptionseigenschaften von Flavin in verschiedenen Oxidations- und Protonierungsformen nach Prof. A. Penzkofer

Strukturformel **A** und Absorptionsquerschnitt **B** von bPAC-Y7F, anionischem Flavin Semichinon $FAD^{\cdot-}$ (Anionradikal), neutralem Flavin Semichinon $FADH^{\cdot}$ (Neutralradikal) und der errechnete Querschnitt des chinoiden Flavin Semichinon $FlQH^{\cdot}$.

Das von Prof. Penzkofer vorgeschlagene Modell erklärt die Irreversibilität der Reaktion; die Ausbildung der Banden bei 340 nm und bei 680 nm wurde der Akkumulation einer Chinoidform unter kontinuierlicher Belichtung zugeordnet. Das dauerhafte Quenchen der Fluoreszenz, das unvollständige Bleichen der 440 nm-Bande und die biexponentielle Rückkehr resultieren aus der Bildung des langlebigen Anionradikals.

Es ist zu bedenken, dass die im primären BLUF-Photozyklus entstehenden Flavinderadikale, das anionische und das neutrale Semichinon, üblicherweise eine Lebenszeit im Picosekunden-Bereich besitzen. Ihre lange Lebenszeit in bPAC-Y7F ist daher ungewöhnlich und kann strukturell durch eine weite räumliche Trennung der Radikalpartner realisiert sein. Unklar sind weiter einige Details der lichtinduzierten Protonierung des Anionradikals: Im primären BLUF-Photozyklus erfolgt die Protonierung dieses Radikals spontan und erfordert keine weitere Anregung. Die Existenz der chinoiden Semichinonform wurde theoretisch angenommen und ihr Spektrum aus den aufgenommenen Daten extrahiert (Abb. 10 B); die Ausbildung dieser Form wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben. Da es sich um ein Tautomer des neutralen Semichinonradikals handelt, ist seine Stabilität fraglich.

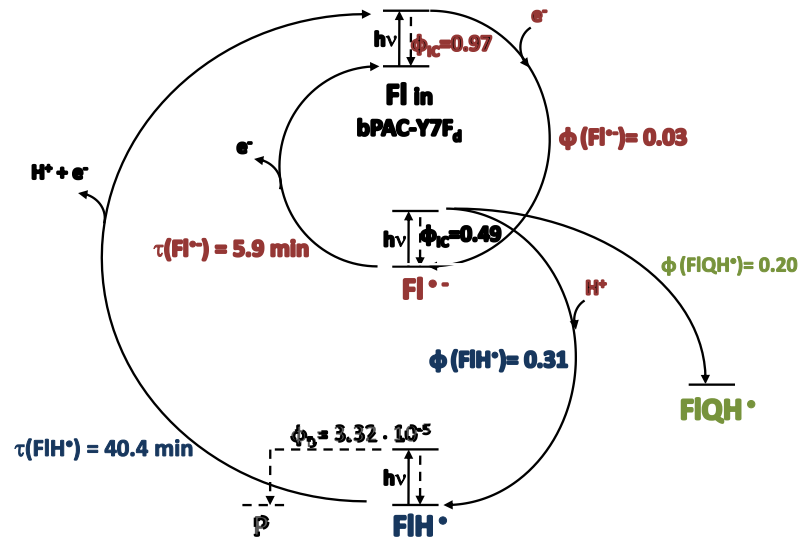


Abbildung 11: Ein mögliches Photozyklusmodell für bPAC-Y7F und Parameter nach Prof. A. Penzkofer

Photozyklus-Schema von bPAC-Y7F mit Parametern. Aus dem Grundzustand angeregtes bPAC-Y7F_d desaktiviert in 97 % oder bildet nach Elektronentransfer das anionische Semichinonradikal Fl⁻ mit einer Quantenausbeute von $\phi_{Fl^-} = 0.03$ und einer Lebenszeit von $\tau_{Fl^-} = 5.9$ min. Anregung von Fl⁻ führt in ca. 50 % zur strahlungslosen Desaktivierung; alternativ kommt es einerseits zu lichtinduziertem Protonentransfer und zur Ausbildung des neutralen Semichinonradikals FlH^{*} mit einer Quantenausbeute von $\phi_{Fl^-} = 0.31$ und einer Lebenszeit von $\tau_{Fl^-} = 40.4$ min. Andererseits wird mit einer Quantenausbeute von $\phi_{FIQH^*} = 0.2$ die irreversible chinoiden Form des Semichinons gebildet. Photodegradation tritt mit einer Quantenausbeute von $\phi_D = 3.3 \cdot 10^{-5}$ auf.

Bei der Bewertung dieser Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass das hier skizzierte Modell einen noch vorläufigen Charakter hat: Der vorliegende Datensatz erlaubt keine globale Analyse der Messdaten und die Intermediatspektren sind nicht Resultat der

Analyse. Es sind daher weitere Messungen notwendig, um zwischen dem hier vorgeschlagenen Modell und anderen kinetisch gleichwertigen Reaktionsschemen differenzieren zu können.

0.4 Abhängigkeit der spezifischen Aktivität bPACs von den Testbedingungen

Die *in vitro* bestimmte spezifische Adenylatzyklase-Aktivität sowie die Licht-zu-Dunkel-Verhältnisse sind von den gewählten Testbedingungen abhängig. Um den Zusammenhang speziell zwischen den Test-Inkubationszeiten und den sich ergebenden spezifischen Aktivitäten zu veranschaulichen, wurde in zwei Ansätzen mit identischer Proteinkonzentration die Produktbildung über einen Zeitraum von 60 min im Dunkeln und über 15 min im Licht verfolgt (Abb. 12 A). Die spezifischen Aktivitäten, die sich am jeweiligen Entnahmezeitpunkt ergeben, verhalten sich reziprok zum prozentualen cAMP-Umsatz und proportional zur Umsatzgeschwindigkeit. Im Licht ist die Aktivitätsabnahme durch den Substratverbrauch begründet; die spezifische Aktivität ist durch die Anfangsgeschwindigkeit bei kurzen Inkubationszeiten bestmöglich beschrieben. Im Dunkeln ist die bei kurzen Inkubationszeiten entstehende Produktmenge so gering, dass die spezifischen Aktivitäten fehleranfällig werden.

Für die Bestimmung der spezifischen Dunkelaktivität wurden daher Testbedingungen mit erhöhter Proteinmenge oder längerer Inkubationszeiten angewendet. Um unter diesen Gesichtspunkten auch den Vergleich mit Proteinen, die eine hohe Dunkelaktivität und eine geringe Aktivitätssteigerung durch Licht besitzen, herstellen zu können, wurden die Testbedingungen spezifisch modifiziert und auf die Referenzbedingungen zurückgerechnet. Abb. 12 B gibt die in dieser Arbeit erhaltenen Durchschnittswerte der spezifischen Dunkel- und Lichtaktivitäten für die jeweilige Inkubationszeit an. Abhängig von den jeweiligen Test-Inkubationszeiten ergeben sich für bPAC Licht-zu-Dunkelverhältnisse im Bereich von 240 bis 8.

0.5 Einfluss von Mercaptoethanol auf die spezifische Aktivität bPACs

Die Zugabe von β -Mercaptoethanol zur Proteinprobe bewirkt eine Steigerung der Adenylatzyklase-Aktivität auf einen bis zu 6-fach höheren Wert (Abbildung 13). Nach der Strukturvorhersage besitzt bPAC mehrere Oberflächencysteine. Die reduzierende Wirkung von β -Mercaptoethanol verhindert die Ausbildung von Disulfidbrücken und stabilisiert bPAC vermutlich auf diese Weise.

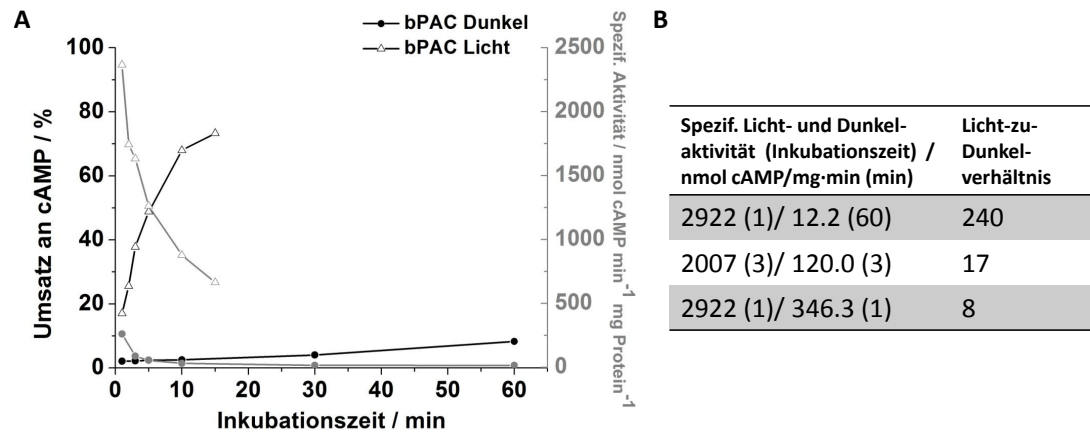


Abbildung 12: cAMP-Umsatz und spezifische Aktivität von bPAC im Zeitverlauf

A Aus einem Ansatz mit $0.19 \mu\text{M}$ bPAC wurde der prozentuale cAMP-Umsatz (linke Y-Achse) über einen Zeitraum von 60 min Dunkelheit (schwarze Kreise) und 10 min Blaulicht (schwarze Dreiecke) bestimmt. Bezogen auf den Inkubationszeitraum ergibt sich der in grau gezeigte Verlauf der spezifischen Aktivitäten im Dunkeln (graue Kreise) und im Licht (graue Dreiecke). **B** Die Tabelle gibt die Durchschnittswerte der spezifischen Dunkel- und Lichtaktivitäten an, die im Rahmen dieser Arbeit bei den angegebenen Inkubationszeiten unter den Standardbedingungen mit bPAC erhalten wurden. Abhängig von der Wahl der Inkubationszeiten erhält man Licht-zu-Dunkelverhältnisse im Bereich von 240 bis 8.

0.6 bPAC-vermittelte cAMP-Produktion in *Xenopus*-Oozyten

Zur Charakterisierung des Aktivitätsverhaltens von bPAC *in vivo* bestimmte Prof. Nagel (Universität Würzburg) die cAMP-Menge in *Xenopus*-Oozyten zu verschiedenen Belichtungszeitpunkten. Ausgehend von einem Dunkelwert bei $3.5 \mu\text{M}$ wurden $100 \mu\text{M}$ cAMP nach einminütiger Belichtung bei $1 \text{ mW} \cdot \text{mm}^{-2}$ erreicht (Abbildung 14 A). Für die cAMP-Konzentration ergab sich in Abhängigkeit der Belichtungsdauer eine Sättigungskurve mit einem Maximalwert von ca. $140 \mu\text{M}$. Legt man den Kontrollwert ($1.5 \mu\text{M}$ cAMP) zu Grunde, so ergibt sich eine nahezu 100-fache Steigerung der cAMP-Konzentration im Licht.

0.7 Größenausschlusschromatographie von nPAC76

nPAC76, das als Monomer ein Molekulargewicht von 45 kDa besitzt, zeigt ein breites, unstrukturiertes Elutionsprofil im Bereich von 20 bis 42 min (Abbildung 14 B). Die Form und der Elutionsbereich lassen darauf schließen, dass nPAC76 hauptsächlich in Form von Aggregaten mit einem Molekulargewicht größer 70 kDa vorliegt.

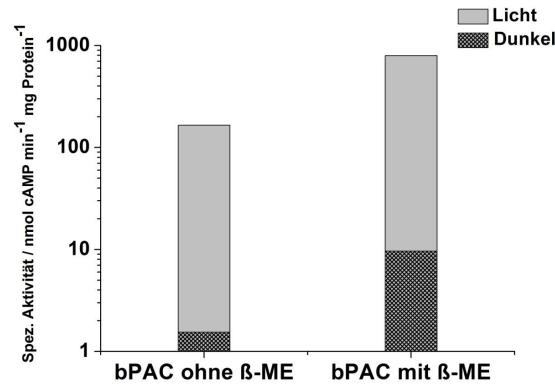


Abbildung 13: Spezifische Aktivität von bPAC in An- und Abwesenheit von 5 mM β-Mercaptoethanol

Die Aktivität einer bPAC-Probe wurde vor und nach Zugabe von β-Mercaptoethanol über einen Zeitraum von 60 min Dunkelheit und 10 min Blaulicht bestimmt. Für die Bestimmung in Abwesenheit des Reduktionsmittels waren 0.38 μM Protein je Ansatz nötig; die Bestimmung mit Mercaptoethanol erfolgte unter Standardbedingungen (0.19 μM).

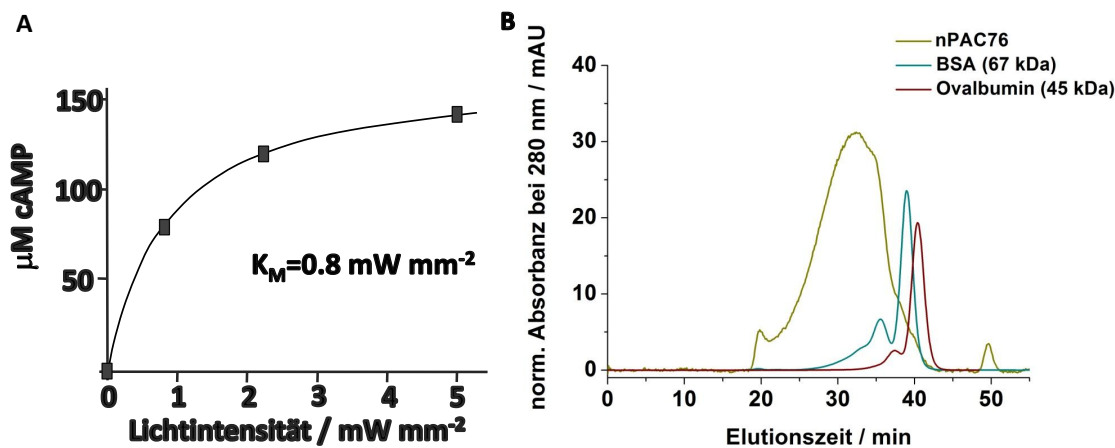


Abbildung 14: Lichtinduzierte cAMP-Produktion in bPAC-exprimierenden *Xenopus*-Oozyten und Elutionsprofile von nPAC76, BSA und Ovalbumin

A cAMP-Konzentrationen in bPAC-exprimierenden *Xenopus*-Oozyten nach Belichtung mit verschiedenen Lichtintensitäten. Die gesamtzelluläre cAMP-Konzentration wurde 4 Tage nach der Injektion von 2 ng bPAC durch G. Nagel mittels eines EIAs bestimmt. Zuvor waren die Zellen 1 min mit einer LED (475 nm) belichtet worden. **B** Größenausschlusschromatographie von nPAC76. Die Standards BSA (67 kDa) und Ovalbumin (45 kDa) eluieren mit ihrem Hauptpeak bei 39 und 40.5 min. nPAC76 eluiert in einem breiten Peak im Bereich von 20 bis 42 min und besitzt ein weiteres Maximum bei 49 min.

Literaturverzeichnis

- [1] R. D. Airan, K. R. Thompson, L. E. Fenno, H. Bernstein, and K. Deisseroth. Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. *Nature*, 458(7241):1025–1029, Apr 2009.
- [2] S. Anderson, V. Dragnea, S. Masuda, J. Ybe, K. Moffat, and C. Bauer. Structure of a novel photoreceptor, the bluf domain of appa from rhodobacter sphaeroides. *Biochemistry*, 44(22):7998–8005, Jun 2005.
- [3] K. Arnold, L. Bordoli, J. Kopp, and T. Schwede. The swiss-model workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22(2):195–201, Jan 2006.
- [4] H. J. Bailes, L.-Y. Zhuang, and R. J. Lucas. Reproducible and sustained regulation of *g_os* signalling using a metazoan opsin as an optogenetic tool. *PLoS One*, 7(1):e30774, 2012.
- [5] T. R. M. Barends, E. Hartmann, J. J. Griesse, T. Beitlich, N. V. Kirienko, D. A. Ryjenkov, J. Reinstein, R. L. Shoeman, M. Gomelsky, and I. Schlichting. Structure and mechanism of a bacterial light-regulated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Nature*, 459(7249):1015–1018, Jun 2009.
- [6] A. Bee, F. J. Culley, I. S. Alkhalife, K. B. Bodman-Smith, J. G. Raynes, and P. A. Bates. Transformation of leishmania mexicana metacyclic promastigotes to amastigote-like forms mediated by binding of human c-reactive protein. *Parasitology*, 122(Pt 5):521–529, May 2001.
- [7] B. Beel, K. Prager, M. Spexard, S. Sasso, D. Weiss, N. Müller, M. Heinnickel, D. Dewez, D. Ikoma, A. R. Grossman, T. Kottke, and M. Mittag. A flavin binding cryptochrome photoreceptor responds to both blue and red light in chlamydomonas reinhardtii. *Plant Cell*, 24(7):2992–3008, Jul 2012.
- [8] A. Berndt, O. Yizhar, L. A. Gunaydin, P. Hegemann, and K. Deisseroth. Bi-stable neural state switches. *Nat Neurosci*, 12(2):229–234, Feb 2009.
- [9] A. Bi, J. Cui, Y.-P. Ma, E. Olshevskaya, M. Pu, A. M. Dizhoor, and Z.-H. Pan. Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron*, 50(1):23–33, Apr 2006.

- [10] C. Bonetti, T. Mathes, I. H. M. van Stokkum, K. M. Mullen, M.-L. Groot, R. van Grondelle, P. Hegemann, and J. T. M. Kennis. Hydrogen bond switching among flavin and amino acid side chains in the bluf photoreceptor observed by ultrafast infrared spectroscopy. *Biophys J*, 95(10):4790–4802, Nov 2008.
- [11] C. Bonetti, M. Stierl, T. Mathes, I. H. M. van Stokkum, K. M. Mullen, T. A. Cohen-Stuart, R. van Grondelle, P. Hegemann, and J. T. M. Kennis. The role of key amino acids in the photoactivation pathway of the synechocystis slr1694 bluf domain. *Biochemistry*, 48(48):11458–11469, Dec 2009.
- [12] E. E. Bosco, J. C. Mulloy, and Y. Zheng. Rac1 gtpase: a „rac“ of all trades. *Cell Mol Life Sci*, 66(3):370–374, Feb 2009.
- [13] E. S. Boyden, F. Zhang, E. Bamberg, G. Nagel, and K. Deisseroth. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*, 8(9):1263–1268, Sep 2005.
- [14] D. Bucher and E. Buchner. Stimulating pacalpa increases miniature excitatory junction potential frequency at the drosophila neuromuscular junction. *J Neurogenet*, 23(1-2):220–224, 2009.
- [15] V. Busskamp, J. Duebel, D. Balya, M. Fradot, T. J. Viney, S. Siegert, A. C. Groner, E. Cabuy, V. Forster, M. Seeliger, M. Biel, P. Humphries, M. Paques, S. Mohand-Said, D. Trono, K. Deisseroth, J. A. Sahel, S. Picaud, and B. Roska. Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. *Science*, 329(5990):413–417, Jul 2010.
- [16] I. Chaves, R. Pokorny, M. Byrdin, N. Hoang, T. Ritz, K. Brettel, L.-O. Essen, G. T. J. van der Horst, A. Batschauer, and M. Ahmad. The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu Rev Plant Biol*, 62:335–364, Jun 2011.
- [17] L. E. Chavez-Noriega and C. F. Stevens. Increased transmitter release at excitatory synapses produced by direct activation of adenylyl cyclase in rat hippocampal slices. *J Neurosci*, 14(1):310–317, Jan 1994.
- [18] Y. Chen, M. J. Cann, T. N. Litvin, V. Iourgenko, M. L. Sinclair, L. R. Levin, and J. Buck. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science*, 289(5479):625–628, Jul 2000.
- [19] G. B. Cohen, D. D. Oprian, and P. R. Robinson. Mechanism of activation and inactivation of opsin: role of glu113 and lys296. *Biochemistry*, 31(50):12592–12601, Dec 1992.
- [20] J. D. Corbin, P. H. Sugden, T. M. Lincoln, and S. L. Keely. Compartmentalization of adenosine 3':5'-monophosphate and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase in heart tissue. *J Biol Chem*, 252(11):3854–3861, Jun 1977.

- [21] A. Danchin. Phylogeny of adenylyl cyclases. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, 27:109–162, 1993.
- [22] T. Domratheva, B. L. Grigorenko, I. Schlichting, and A. V. Nemukhin. Molecular models predict light-induced glutamine tautomerization in bluf photoreceptors. *Biophys J*, 94(10):3872–3879, May 2008.
- [23] V. Dragnea, A. I. Arunkumar, C. W. Lee, D. P. Giedroc, and C. E. Bauer. A q63e rhodobacter sphaeroides appa bluf domain mutant is locked in a pseudo-light-excited signaling state. *Biochemistry*, 49(50):10682–10690, Dec 2010.
- [24] V. Dragnea, A. I. Arunkumar, H. Yuan, D. P. Giedroc, and C. E. Bauer. Spectroscopic studies of the appa bluf domain from rhodobacter sphaeroides: addressing movement of tryptophan 104 in the signaling state. *Biochemistry*, 48(42):9969–9979, Oct 2009.
- [25] V. Dragnea, M. Waegle, S. Balascuta, C. Bauer, and B. Dragnea. Time-resolved spectroscopic studies of the appa blue-light receptor bluf domain from rhodobacter sphaeroides. *Biochemistry*, 44(49):15978–15985, Dec 2005.
- [26] C. L. Drum, S.-Z. Yan, J. Bard, Y.-Q. Shen, D. Lu, S. Soelaiman, Z. Grabarek, A. Bohm, and W.-J. Tang. Structural basis for the activation of anthrax adenylyl cyclase exotoxin by calmodulin. *Nature*, 415(6870):396–402, Jan 2002.
- [27] M. Efetova, L. Petereit, K. Rosiewicz, G. Overend, F. Haußig, B. T. Hovemann, P. Cabrero, J. A. T Dow, and M. Schwärzel. Separate roles of pka and epac in renal function unraveled by the optogenetic control of camp levels in vivo. *J Cell Sci*, Dec 2012.
- [28] G. Fisone, A. Borgkvist, and A. Usiello. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cell Mol Life Sci*, 61(7-8):857–872, Apr 2004.
- [29] L. K. Fritz-Laylin, M. L. Ginger, C. Walsh, S. C. Dawson, and C. Fulton. The naegleria genome: a free-living microbial eukaryote lends unique insights into core eukaryotic cell biology. *Res Microbiol*, 162(6):607–618, 2011.
- [30] L. K. Fritz-Laylin, S. E. Prochnik, M. L. Ginger, J. B. Dacks, M. L. Carpenter, M. C. Field, A. Kuo, A. Paredes, J. Chapman, J. Pham, S. Shu, R. Neupane, M. Cipriano, J. Mancuso, H. Tu, A. Salamov, E. Lindquist, H. Shapiro, S. Lucas, I. V. Grigoriev, W. Z. Cande, C. Fulton, D. S. Rokhsar, and S. C. Dawson. The genome of naegleria gruberi illuminates early eukaryotic versatility. *Cell*, 140(5):631–642, Mar 2010.
- [31] Y. Fukushima, Y. Murai, K. Okajima, M. Ikeuchi, and S. Itoh. Photoreactions of tyr8- and gln50-mutated bluf domains of the pixd protein of thermosynechococcus elongatus bp-1: photoconversion at low temperature without tyr8. *Biochemistry*, 47(2):660–669, Jan 2008.
- [32] Y. Fukushima, K. Okajima, Y. Shibata, M. Ikeuchi, and S. Itoh. Primary intermediate in the photocycle of a blue-light sensory bluf fad-protein, tll0078, of thermosynechococcus elongatus bp-1. *Biochemistry*, 44(13):5149–5158, Apr 2005.

- [33] D. T. Gallagher, S.-K. Kim, H. Robinson, and P. T. Reddy. Active-site structure of class iv adenylyl cyclase and transphyletic mechanism. *J Mol Biol*, 405(3):787–803, Jan 2011.
- [34] M. Gauden, J. S. Grinstead, W. Laan, I. H. M. van Stokkum, M. Avila-Perez, K. C. Toh, R. Boelens, R. Kaptein, R. van Grondelle, K. J. Hellingwerf, and J. T. M. Kennis. On the role of aromatic side chains in the photoactivation of bluf domains. *Biochemistry*, 46(25):7405–7415, Jun 2007.
- [35] M. Gauden, I. H. M. van Stokkum, J. M. Key, D. C. Lühns, R. van Grondelle, P. Hegemann, and J. T. M. Kennis. Hydrogen-bond switching through a radical pair mechanism in a flavin-binding photoreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(29):10895–10900, Jul 2006.
- [36] M. Gauden, S. Yeremenko, W. Laan, I. H. M. van Stokkum, J. A. Ihalainen, R. van Grondelle, K. J. Hellingwerf, and J. T. M. Kennis. Photocycle of the flavin-binding photoreceptor appa, a bacterial transcriptional antirepressor of photosynthesis genes. *Biochemistry*, 44(10):3653–3662, Mar 2005.
- [37] M. Gomelsky. camp, c-di-gmp, c-di-amp and now cgmp: bacteria use them all! *Mol Microbiol*, 79(3):562–565, Feb 2011.
- [38] M. Gomelsky and S. Kaplan. Appa, a redox regulator of photosystem formation in rhodobacter sphaeroides 2.4.1, is a flavoprotein. identification of a novel fad binding domain. *J Biol Chem*, 273(52):35319–35325, Dec 1998.
- [39] M. Gomelsky and G. Klug. Bluf: a novel fad-binding domain involved in sensory transduction in microorganisms. *Trends Biochem Sci*, 27(10):497–500, Oct 2002.
- [40] B. D. Gomperts, K. I. M., and T. P. E.R. *Signal transduction*. Elsevier, 2009.
- [41] M. Goto, K. Kadoshima-Yamaoka, M. Murakawa, R. Yoshioka, Y. Tanaka, H. Inoue, H. Murafuji, S. Kanki, Y. Hayashi, K. Nagahira, A. Ogata, T. Nakatsuka, and Y. Fukuda. Phosphodiesterase 7a inhibitor asb16165 impairs proliferation of keratinocytes in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol*, 633(1-3):93–97, May 2010.
- [42] J. Götze and P. Saalfrank. Serine in bluf domains displays spectral importance in computational models. *J Photochem Photobiol B*, 94(2):87–95, Feb 2009.
- [43] V. Gradinaru, M. Mogri, K. R. Thompson, J. M. Henderson, and K. Deisseroth. Optical deconstruction of parkinsonian neural circuitry. *Science*, 324(5925):354–359, Apr 2009.
- [44] V. Gradinaru, F. Zhang, C. Ramakrishnan, J. Mattis, R. Prakash, I. Diester, I. Goshen, K. R. Thompson, and K. Deisseroth. Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics. *Cell*, 141(1):154–165, Apr 2010.
- [45] J. S. Grinstead, S.-T. D. Hsu, W. Laan, A. M. J. J. Bonvin, K. J. Hellingwerf, R. Boelens, and R. Kaptein. The solution structure of the appa bluf domain: insight into the mechanism of light-induced signaling. *ChemBiochem*, 7(1):187–193, Jan 2006.

- [46] N. Guex and M. C. Peitsch. Swiss-model and the swiss-pdbviewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18(15):2714–2723, Dec 1997.
- [47] L. A. Gunaydin, O. Yizhar, A. Berndt, V. S. Sohal, K. Deisseroth, and P. Hegemann. Ultrafast optogenetic control. *Nat Neurosci*, 13(3):387–392, Mar 2010.
- [48] D. J. Haisenleder, M. Yasin, and J. C. Marshall. Enhanced effectiveness of pulsatile 3',5'-cyclic adenosine monophosphate in stimulating prolactin and alpha-subunit gene expression. *Endocrinology*, 131(6):3027–3033, Dec 1992.
- [49] X. Han and E. S. Boyden. Multiple-color optical activation, silencing, and desynchronization of neural activity, with single-spike temporal resolution. *PLoS One*, 2(3):e299, 2007.
- [50] S. M. Harper, L. C. Neil, and K. H. Gardner. Structural basis of a phototropin light switch. *Science*, 301(5639):1541–1544, Sep 2003.
- [51] E. Hasegawa, H. Hayashi, S. Asakura, and R. Kamiya. Stimulation of in vitro motility of chlamydomonas axonemes by inhibition of camp-dependent phosphorylation. *Cell Motil Cytoskeleton*, 8(4):302–311, 1987.
- [52] K. Hasegawa, S. Masuda, and T. aki Ono. Structural intermediate in the photocycle of a bluf (sensor of blue light using fad) protein slr1694 in a cyanobacterium synechocystis sp. pcc6803. *Biochemistry*, 43(47):14979–14986, Nov 2004.
- [53] K. Hasegawa, S. Masuda, and T. aki Ono. Light induced structural changes of a full-length protein and its bluf domain in ycgf(blrp), a blue-light sensing protein that uses fad (bluf). *Biochemistry*, 45(11):3785–3793, Mar 2006.
- [54] K. Hasegawa, S. Masuda, and T.-A. Ono. Spectroscopic analysis of the dark relaxation process of a photocycle in a sensor of blue light using fad (bluf) protein slr1694 of the cyanobacterium synechocystis sp. pcc6803. *Plant Cell Physiol*, 46(1):136–146, Jan 2005.
- [55] P. Hegemann and M. Fischer. Algal eyes. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1990.
- [56] M. Heijde and R. Ulm. Uv-b photoreceptor-mediated signalling in plants. *Trends Plant Sci*, 17(4):230–237, Apr 2012.
- [57] S. Hinck, T. R. Neu, G. Lavik, M. Mussmann, D. de Beer, and H. M. Jonkers. Physiological adaptation of a nitrate-storing beggiatoa sp. to diel cycling in a phototrophic hypersaline mat. *Appl Environ Microbiol*, 73(21):7013–7022, Nov 2007.
- [58] R. V. Iancu, G. Ramamurthy, S. Warrier, V. O. Nikolaev, M. J. Lohse, S. W. Jones, and R. D. Harvey. Cytoplasmic camp concentrations in intact cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 295(2):C414–C422, Aug 2008.

- [59] K. Ikura, T. Kokubu, S. Natsuka, A. Ichikawa, M. Adachi, K. Nishihara, H. Yanagi, and S. Utsumi. Co-overexpression of folding modulators improves the solubility of the recombinant guinea pig liver transglutaminase expressed in escherichia coli. *Prep Biochem Biotechnol*, 32(2):189–205, May 2002.
- [60] M. Iseki, S. Matsunaga, A. Murakami, K. Ohno, K. Shiga, K. Yoshida, M. Sugai, T. Takahashi, T. Hori, and M. Watanabe. A blue-light-activated adenylyl cyclase mediates photoavoidance in euglena gracilis. *Nature*, 415(6875):1047–1051, Feb 2002.
- [61] T. Ishizuka, M. Kakuda, R. Araki, and H. Yawo. Kinetic evaluation of photosensitivity in genetically engineered neurons expressing green algae light-gated channels. *Neurosci Res*, 54(2):85–94, Feb 2006.
- [62] S. Ito, A. Murakami, M. Iseki, T. Takahashi, S. Higashi, and M. Watanabe. Differentiation of photocycle characteristics of flavin-binding bluf domains of α - and β -subunits of photoactivated adenylyl cyclase of euglena gracilis. *Photochem Photobiol Sci*, 9(10):1327–1335, Oct 2010.
- [63] S. Ito, A. Murakami, K. Sato, Y. Nishina, K. Shiga, T. Takahashi, S. Higashi, M. Iseki, and M. Watanabe. Photocycle features of heterologously expressed and assembled eukaryotic flavin-binding bluf domains of photoactivated adenylyl cyclase (pac), a blue-light receptor in euglena gracilis. *Photochem Photobiol Sci*, 4(9):762–769, Sep 2005.
- [64] M. Jazayeri, Z. Lindbloom-Brown, and G. D. Horwitz. Saccadic eye movements evoked by optogenetic activation of primate v1. *Nat Neurosci*, Sep 2012.
- [65] E. S. Johnson and G. Blobel. Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein sumo to the yeast septins. *J Cell Biol*, 147(5):981–994, Nov 1999.
- [66] A. Jung, T. Domratcheva, M. Tarutina, Q. Wu, W.-H. Ko, R. L. Shoeman, M. Gomelsky, K. H. Gardner, and I. Schlichting. Structure of a bacterial bluf photoreceptor: insights into blue light-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(35):12350–12355, Aug 2005.
- [67] A. Jung, J. Reinstein, T. Domratcheva, R. L. Shoeman, and I. Schlichting. Crystal structures of the appa bluf domain photoreceptor provide insights into blue light-mediated signal transduction. *J Mol Biol*, 362(4):717–732, Sep 2006.
- [68] D. Kalia, G. Merey, S. Nakayama, Y. Zheng, J. Zhou, Y. Luo, M. Guo, B. T. Roembke, and H. O. Sintim. Nucleotide, c-di-gmp, c-di-amp, cgmp, camp, (p)ppgpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chem Soc Rev*, 42(1):305–341, Jan 2013.
- [69] T. Kanazawa, S. Ren, M. Maekawa, K. Hasegawa, F. Arisaka, M. Hyodo, Y. Hayakawa, H. Ohta, and S. Masuda. Biochemical and physiological characterization of a bluf protein-eal protein complex involved in blue light-dependent degradation of cyclic diguanylate in

- the purple bacterium rhodospseudomonas palustris. *Biochemistry*, 49(50):10647–10655, Dec 2010.
- [70] M. J. Kennedy, R. M. Hughes, L. A. Peteya, J. W. Schwartz, M. D. Ehlers, and C. L. Tucker. Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nat Methods*, 7(12):973–975, Dec 2010.
 - [71] M. Khrenova, T. Domratheva, B. Grigorenko, and A. Nemukhin. Coupling between the bluf and eal domains in the blue light-regulated phosphodiesterase blrp1. *J Mol Model*, 17(7):1579–1586, Jul 2011.
 - [72] L. A. Kirkman, L. M. Weiss, and K. Kim. Cyclic nucleotide signaling in toxoplasma gondii bradyzoite differentiation. *Infect Immun*, 69(1):148–153, Jan 2001.
 - [73] A. Kita, K. Okajima, Y. Morimoto, M. Ikeuchi, and K. Miki. Structure of a cyanobacterial bluf protein, tll0078, containing a novel fad-binding blue light sensor domain. *J Mol Biol*, 349(1):1–9, May 2005.
 - [74] T. M. Konijn, J. G. van de Meene, Y. Y. Chang, D. S. Barkley, and J. T. Bonner. Identification of adenosine-3',5'-monophosphate as the bacterial attractant for myxamoebae of dictyostelium discoideum. *J Bacteriol*, 99(2):510–512, Aug 1969.
 - [75] Y. Koumura, T. Suzuki, S. Yoshikawa, M. Watanabe, and M. Iseki. The origin of photoactivated adenylyl cyclase (pac), the euglena blue-light receptor: phylogenetic analysis of orthologues of pac subunits from several euglenoids and trypanosome-type adenylyl cyclases from euglena gracilis. *Photochem Photobiol Sci*, 3(6):580–586, Jun 2004.
 - [76] B. J. Kraft, S. Masuda, J. Kikuchi, V. Dragnea, G. Tollin, J. M. Zaleski, and C. E. Bauer. Spectroscopic and mutational analysis of the blue-light photoreceptor appa: a novel photocycle involving flavin stacking with an aromatic amino acid. *Biochemistry*, 42(22):6726–6734, Jun 2003.
 - [77] W. Laan, T. Bednarz, J. Heberle, and K. J. Hellingwerf. Chromophore composition of a heterologously expressed bluf-domain. *Photochem Photobiol Sci*, 3(11-12):1011–1016, 2004.
 - [78] W. Laan, M. Gauden, S. Yeremenko, R. van Grondelle, J. T. M. Kennis, and K. J. Hellingwerf. On the mechanism of activation of the bluf domain of appa. *Biochemistry*, 45(1):51–60, Jan 2006.
 - [79] W. Laan, M. A. van der Horst, I. H. van Stokkum, and K. J. Hellingwerf. Initial characterization of the primary photochemistry of appa, a blue-light-using flavin adenine dinucleotide-domain containing transcriptional antirepressor protein from rhodobacter sphaeroides: a key role for reversible intramolecular proton transfer from the flavin adenine dinucleotide chromophore to a conserved tyrosine? *Photochem Photobiol*, 78(3):290–297, Sep 2003.

- [80] D. Ladant and A. Ullmann. Bordatella pertussis adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol*, 7(4):172–176, Apr 1999.
- [81] U. K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(5259):680–685, Aug 1970.
- [82] P. S. Lagali, D. Balya, G. B. Awatramani, T. A. Münch, D. S. Kim, V. Busskamp, C. L. Cepko, and B. Roska. Light-activated channels targeted to on bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. *Nat Neurosci*, 11(6):667–675, Jun 2008.
- [83] J. S. Lamb, B. D. Zoltowski, S. A. Pabit, L. Li, B. R. Crane, and L. Pollack. Illuminating solution responses of a lov domain protein with photocoupled small-angle x-ray scattering. *J Mol Biol*, 393(4):909–919, Nov 2009.
- [84] A. Levskaya, O. D. Weiner, W. A. Lim, and C. A. Voigt. Spatiotemporal control of cell signalling using a light-switchable protein interaction. *Nature*, 461(7266):997–1001, Oct 2009.
- [85] J. F. Liewald, M. Brauner, G. J. Stephens, M. Bouhours, C. Schultheis, M. Zhen, and A. Gottschalk. Optogenetic analysis of synaptic function. *Nat Methods*, 5(10):895–902, Oct 2008.
- [86] J. Y. Lin, M. Z. Lin, P. Steinbach, and R. Y. Tsien. Characterization of engineered channelrhodopsin variants with improved properties and kinetics. *Biophys J*, 96(5):1803–1814, Mar 2009.
- [87] J. U. Linder and J. E. Schultz. The class iii adenylyl cyclases: multi-purpose signalling modules. *Cell Signal*, 15(12):1081–1089, Dec 2003.
- [88] H. Liu, G. Gomez, S. Lin, S. Lin, and C. Lin. Optogenetic control of transcription in zebrafish. *PLoS One*, 7(11):e50738, 2012.
- [89] H. Liu, X. Yu, K. Li, J. Klejnot, H. Yang, D. Lisiero, and C. Lin. Photoexcited cry2 interacts with cib1 to regulate transcription and floral initiation in arabidopsis. *Science*, 322(5907):1535–1539, Dec 2008.
- [90] J. Looser, S. Schröder-Lang, P. Hegemann, and G. Nagel. Mechanistic insights in light-induced camp production by photoactivated adenylyl cyclase alpha (pacalpha). *Biol Chem*, 390(11):1105–1111, Nov 2009.
- [91] A. Losi and W. Gärtner. Old chromophores, new photoactivation paradigms, trendy applications: flavins in blue light-sensing photoreceptors. *Photochem Photobiol*, 87(3):491–510, 2011.
- [92] A. Losi and W. Gärtner. The evolution of flavin-binding photoreceptors: an ancient chromophore serving trendy blue-light sensors. *Annu Rev Plant Biol*, 63:49–72, Jun 2012.

- [93] L. Ma, L. Zablow, E. R. Kandel, and S. A. Siegelbaum. Cyclic amp induces functional presynaptic boutons in hippocampal ca3-ca1 neuronal cultures. *Nat Neurosci*, 2(1):24–30, Jan 1999.
- [94] J. G. Marblestone, S. C. Edavettal, Y. Lim, P. Lim, X. Zuo, and T. R. Butt. Comparison of sumo fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with sumo. *Protein Sci*, 15(1):182–189, Jan 2006.
- [95] V. Massey and G. Palmer. On the existence of spectrally distinct classes of flavoprotein semiquinones. a new method for the quantitative production of flavoprotein semiquinones. *Biochemistry*, 5(10):3181–3189, Oct 1966.
- [96] S. Masuda and C. E. Bauer. Appa is a blue light photoreceptor that antirepresses photosynthesis gene expression in rhodobacter sphaeroides. *Cell*, 110(5):613–623, Sep 2002.
- [97] S. Masuda, K. Hasegawa, and T. aki Ono. Light-induced structural changes of apoprotein and chromophore in the sensor of blue light using fad (bluf) domain of appa for a signaling state. *Biochemistry*, 44(4):1215–1224, Feb 2005.
- [98] S. Masuda, K. Hasegawa, and T. aki Ono. Tryptophan at position 104 is involved in transforming light signal into changes of beta-sheet structure for the signaling state in the bluf domain of appa. *Plant Cell Physiol*, 46(12):1894–1901, Dec 2005.
- [99] S. Masuda, K. Hasegawa, A. Ishii, and T. aki Ono. Light-induced structural changes in a putative blue-light receptor with a novel fad binding fold sensor of blue-light using fad (bluf); slr1694 of synechocystis sp. pcc6803. *Biochemistry*, 43(18):5304–5313, May 2004.
- [100] S. Masuda, K. Hasegawa, H. Ohta, and T.-a. Ono. Crucial role in light signal transduction for the conserved met93 of the bluf protein pixd/slr1694. *Plant Cell Physiol*, 49(10):1600–1606, Oct 2008.
- [101] S. Masuda, Y. Tomida, H. Ohta, and K.-I. Takamiya. The critical role of a hydrogen bond between gln63 and trp104 in the blue-light sensing bluf domain that controls appa activity. *J Mol Biol*, Mar 2007.
- [102] T. Mathes, I. H. M. van Stokkum, M. Stierl, and J. T. M. Kennis. Redox modulation of flavin and tyrosine determines photoinduced proton-coupled electron transfer and photoactivation of bluf photoreceptors. *J Biol Chem*, Jul 2012.
- [103] D. Matsuoka and S. Tokutomi. Blue light-regulated molecular switch of ser/thr kinase in phototropin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(37):13337–13342, Sep 2005.
- [104] K. A. McDonough and A. Rodriguez. The myriad roles of cyclic amp in microbial pathogens: from signal to sword. *Nat Rev Microbiol*, 10(1):27–38, Jan 2012.

- [105] S. Metz, A. Jäger, and G. Klug. In vivo sensitivity of blue-light-dependent signaling mediated by appa/ppsr or prrb/prra in rhodobacter sphaeroides. *J Bacteriol*, 191(13):4473–4477, Jul 2009.
- [106] H. J. Mills, R. J. Martinez, S. Story, and P. A. Sobecky. Identification of members of the metabolically active microbial populations associated with beggiatoa species mat communities from gulf of mexico cold-seep sediments. *Appl Environ Microbiol*, 70(9):5447–5458, Sep 2004.
- [107] B. Miroux and J. E. Walker. Over-production of proteins in escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol*, 260(3):289–298, Jul 1996.
- [108] D. Mitra, X. Yang, and K. Moffat. Crystal structures of aureochrome1 lov suggest new design strategies for optogenetics. *Structure*, 20(4):698–706, Apr 2012.
- [109] A. Möglich, R. A. Ayers, and K. Moffat. Design and signaling mechanism of light-regulated histidine kinases. *J Mol Biol*, 385(5):1433–1444, Feb 2009.
- [110] A. Möglich and K. Moffat. Engineered photoreceptors as novel optogenetic tools. *Photochem Photobiol Sci*, 9(10):1286–1300, Oct 2010.
- [111] M. M. Møller, L. P. Nielsen, and B. B. Jørgensen. Oxygen responses and mat formation by beggiatoa spp. *Appl Environ Microbiol*, 50(2):373–382, Aug 1985.
- [112] S.-A. Morgan, S. Al-Abdul-Wahid, and G. A. Woolley. Structure-based design of a photo-controlled dna binding protein. *J Mol Biol*, 399(1):94–112, May 2010.
- [113] O. V. Moskvina, S. Kaplan, M.-A. Gilles-Gonzalez, and M. Gomelsky. Novel heme-based oxygen sensor with a revealing evolutionary history. *J Biol Chem*, 282(39):28740–28748, Sep 2007.
- [114] T.-C. Mou, N. Masada, D. M. F. Cooper, and S. R. Sprang. Structural basis for inhibition of mammalian adenylyl cyclase by calcium. *Biochemistry*, 48(15):3387–3397, Apr 2009.
- [115] M. A. Mussi, J. A. Gaddy, M. Cabruja, B. A. Arivett, A. M. Viale, R. Rasia, and L. A. Actis. The opportunistic human pathogen acinetobacter baumannii senses and responds to light. *J Bacteriol*, 192(24):6336–6345, Dec 2010.
- [116] T. Nagahama, T. Suzuki, S. Yoshikawa, and M. Iseki. Functional transplant of photoactivated adenylyl cyclase (pac) into aplysia sensory neurons. *Neurosci Res*, 59(1):81–88, Sep 2007.
- [117] G. Nagel, M. Brauner, J. F. Liewald, N. Adeishvili, E. Bamberg, and A. Gottschalk. Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of caenorhabditis elegans triggers rapid behavioral responses. *Curr Biol*, 15(24):2279–2284, Dec 2005.

- [118] G. Nagel, D. Ollig, M. Fuhrmann, S. Kateriya, A. M. Musti, E. Bamberg, and P. Hegemann. Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science*, 296(5577):2395–2398, Jun 2002.
- [119] M. Ntefidou and D.-P. Häder. Photoactivated adenylyl cyclase (pac) genes in the flagellate euglena gracilis mutant strains. *Photochem Photobiol Sci*, 4(9):732–739, Sep 2005.
- [120] M. Ntefidou, M. Iseki, M. Watanabe, M. Lebert, and D.-P. Häder. Photoactivated adenylyl cyclase controls phototaxis in the flagellate euglena gracilis. *Plant Physiol*, 133(4):1517–1521, Dec 2003.
- [121] K. Obanayama, H. Kobayashi, K. Fukushima, and M. Sakurai. Structures of the chromophore binding sites in bluf domains as studied by molecular dynamics and quantum chemical calculations. *Photochem Photobiol*, 84(4):1003–1010, 2008.
- [122] E. Oh, T. Maejima, C. Liu, E. Deneris, and S. Herlitze. Substitution of 5-HT_{1A} receptor signaling by a light-activated G protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, 285(40):30825–30836, Oct 2010.
- [123] K. Okajima, Y. Fukushima, H. Suzuki, A. Kita, Y. Ochiai, M. Katayama, Y. Shibata, K. Miki, T. Noguchi, S. Itoh, and M. Ikeuchi. Fate determination of the flavin photoreceptions in the cyanobacterial blue light receptor tepixd (tll0078). *J Mol Biol*, 363(1):10–18, Oct 2006.
- [124] K. Okajima, S. Yoshihara, Y. Fukushima, X. Geng, M. Katayama, S. Higashi, M. Watanabe, S. Sato, S. Tabata, Y. Shibata, S. Itoh, and M. Ikeuchi. Biochemical and functional characterization of bluf-type flavin-binding proteins of two species of cyanobacteria. *J Biochem (Tokyo)*, 137(6):741–750, Jun 2005.
- [125] N. Otmakhov, L. Khibnik, N. Otmakhova, S. Carpenter, S. Riahi, B. Asrican, and J. Lisman. Forskolin-induced ltp in the ca1 hippocampal region is nmda receptor dependent. *J Neurophysiol*, 91(5):1955–1962, May 2004.
- [126] S. H. Pan and B. A. Malcolm. Reduced background expression and improved plasmid stability with pet vectors in bl21 (de3). *Biotechniques*, 29(6):1234–1238, Dec 2000.
- [127] A. Penzkofer, M. Stierl, P. Hegemann, and S. Kateriya. Photo-dynamics of the bluf domain containing soluble adenylyl cyclase (npac) from the amoebflagellate naegleria gruberi neg-m strain. *Chemical Physics*, 387:25–38, 2011.
- [128] A. Penzkofer, M. Stierl, P. Hegemann, and S. Kateriya. Thermal protein unfolding in photo-activated adenylyl cyclase nano-clusters from the amoebflagellate naegleria gruberi neg-m strain. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chem.*, 225:42–51, 2011.
- [129] A. Penzkofer, M. Stierl, P. Hegemann, and S. Kateriya. Absorption and fluorescence characteristics of photo-activated adenylyl cyclase nano-clusters from the amoebflagellate naegleria gruberi neg-m strain. *Chemical Physics*, 292:46–54, 2012.

- [130] A. Penzkofer, M. Tanwar, S. Veetil, S. Kateriya, M. Stierl, and P. Hegemann. Photo-dynamics and thermal behavior of the bluf domain containing adenylate cyclase ngpac2 from the amoebflagellate naegleria gruberi neg-m strain. *Chemical Physics*, 412:96–108, 2013.
- [131] A. Peterkofsky, A. Reizer, J. Reizer, N. Gollop, P. P. Zhu, and N. Amin. Bacterial adenyl cyclases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 44:31–65, 1993.
- [132] E. Piccini and M. Mammi. Motor apparatus of euglena gracilis: ultrastructure of the basal portion of the flagellum and the paraflagellar body. *Boll Zool*, 45:405–414, 1978.
- [133] K. L. Pierce, R. T. Premont, and R. J. Lefkowitz. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(9):639–650, Sep 2002.
- [134] E. Ponimaskin, M. Heine, A. Zeug, T. Voyno-Yasenetskaya, and P. Salonikidis. *Serotonin Receptors in Neurobiology*. CRC Press, 2007.
- [135] M. Prigge, F. Schneider, S. P. Tsunoda, C. Shilyansky, J. Wietek, K. Deisseroth, and P. Hegemann. Color-tuned channelrhodopsins for multiwavelength optogenetics. *J Biol Chem*, 287(38):31804–31812, Sep 2012.
- [136] S. Rajagopal, J. M. Key, E. B. Purcell, D. J. Boerema, and K. Moffat. Purification and initial characterization of a putative blue light-regulated phosphodiesterase from escherichia coli. *Photochem Photobiol*, 80(3):542–547, 2004.
- [137] A. Rauch, M. Leipelt, M. Russwurm, and C. Steegborn. Crystal structure of the guanylyl cyclase cya2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(41):15720–15725, Oct 2008.
- [138] S. Ren, M. Sawada, K. Hasegawa, Y. Hayakawa, H. Ohta, and S. Masuda. A pixd-papb chimeric protein reveals the function of the bluf domain c-terminal α -helices for light-signal transduction. *Plant Cell Physiol*, Jul 2012.
- [139] T. C. Rich, T. E. Tse, J. G. Rohan, J. Schaack, and J. W. Karpen. In vivo assessment of local phosphodiesterase activity using tailored cyclic nucleotide-gated channels as camp sensors. *J Gen Physiol*, 118(1):63–78, Jul 2001.
- [140] N. C. Rockwell and J. C. Lagarias. A brief history of phytochromes. *Chemphyschem*, 11(6):1172–1180, Apr 2010.
- [141] D. A. Ryjenkov, M. Tarutina, O. V. Moskvina, and M. Gomelsky. Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the ggdef protein domain. *J Bacteriol*, 187(5):1792–1798, Mar 2005.
- [142] M.-H. Ryu, O. V. Moskvina, J. Siltberg-Liberles, and M. Gomelsky. Natural and engineered photoactivated nucleotidyl cyclases for optogenetic applications. *J Biol Chem*, 285(53):41501–41508, Dec 2010.

- [143] K. Sadeghian, M. Bocola, and M. Schütz. A conclusive mechanism of the photoinduced reaction cascade in blue light using flavin photoreceptors. *J Am Chem Soc*, 130(37):12501–12513, Sep 2008.
- [144] V. Sample, L. M. DiPilato, J. H. Yang, Q. Ni, J. J. Saucerman, and J. Zhang. Regulation of nuclear pka revealed by spatiotemporal manipulation of cyclic amp. *Nat Chem Biol*, 8(4):375–382, Apr 2012.
- [145] S. Schröder-Lang, M. Schwärzel, R. Seifert, T. Strünker, S. Kateriya, J. Looser, M. Watanabe, U. B. Kaupp, P. Hegemann, and G. Nagel. Fast manipulation of cellular camp level by light in vivo. *Nat Methods*, 4(1):39–42, Jan 2007.
- [146] L. Schrödinger. The PyMOL molecular graphics system, version 1.3r1. August 2010.
- [147] C. Schroeder, K. Werner, H. Otten, S. Krätzig, H. Schwalbe, and L.-O. Essen. Influence of a joining helix on the bluf domain of the ycgf photoreceptor from escherichia coli. *Chembiochem*, 9(15):2463–2473, Oct 2008.
- [148] T. Schwede, J. Kopp, N. Guex, and M. C. Peitsch. Swiss-model: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res*, 31(13):3381–3385, Jul 2003.
- [149] S. Seino and T. Shibasaki. Pka-dependent and pka-independent pathways for camp-regulated exocytosis. *Physiol Rev*, 85(4):1303–1342, Oct 2005.
- [150] F. Siebert and P. Hildebrandt. *Vibrational Spectroscopy in Life Science*. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2007.
- [151] L. S. Siegel, P. B. Hylemon, and P. Phibbs, Jr. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate levels and activities of adenylate cyclase and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase in pseudomonas and bacteroides. *J Bacteriol*, 129(1):87–96, Jan 1977.
- [152] S. C. Sinha, M. Wetterer, S. R. Sprang, J. E. Schultz, and J. U. Linder. Origin of asymmetry in adenylyl cyclases: structures of mycobacterium tuberculosis rv1900c. *EMBO J*, 24(4):663–673, Feb 2005.
- [153] A. Skerra. Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in escherichia coli. *Gene*, 151(1-2):131–135, Dec 1994.
- [154] V. S. Sohal, F. Zhang, O. Yizhar, and K. Deisseroth. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*, 459(7247):698–702, Jun 2009.
- [155] C. Steegborn, T. N. Litvin, L. R. Levin, J. Buck, and H. Wu. Bicarbonate activation of adenylyl cyclase via promotion of catalytic active site closure and metal recruitment. *Nat Struct Mol Biol*, 12(1):32–37, Jan 2005.

- [156] M. Stierl, P. Stumpf, D. Udvari, R. Gueta, R. Hagedorn, A. Losi, W. Gärtner, L. Petereit, M. Efetova, M. Schwarzel, T. G. Oertner, G. Nagel, and P. Hegemann. Light modulation of cellular camp by a small bacterial photoactivated adenylyl cyclase, bpac, of the soil bacterium *beggiatoa*. *J Biol Chem*, 286(2):1181–1188, Jan 2011.
- [157] R. K. Sunahara, A. Beuve, J. J. Tesmer, S. R. Sprang, D. L. Garbers, and A. G. Gilman. Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases. *J Biol Chem*, 273(26):16332–16338, Jun 1998.
- [158] R. Takahashi, K. Okajima, H. Suzuki, H. Nakamura, M. Ikeuchi, and T. Noguchi. Ftir study on the hydrogen bond structure of a key tyrosine residue in the flavin-binding blue light sensor tepixd from *thermosynechococcus elongatus*. *Biochemistry*, 46(22):6459–6467, Jun 2007.
- [159] K. Tanaka, Y. Nakasone, K. Okajima, M. Ikeuchi, S. Tokutomi, and M. Terazima. Light-induced conformational change and transient dissociation reaction of the bluf photoreceptor *synechocystis pixd* (slr1694). *J Mol Biol*, 409(5):773–785, Jun 2011.
- [160] K. Tanaka, Y. Nakasone, K. Okajima, M. Ikeuchi, S. Tokutomi, and M. Terazima. A way to sense light intensity: Multiple-excitation of the bluf photoreceptor tepixd suppresses conformational change. *FEBS Lett*, 585(5):786–790, Mar 2011.
- [161] K. Tanaka, Y. Nakasone, K. Okajima, M. Ikeuchi, S. Tokutomi, and M. Terazima. Time-resolved tracking of interprotein signal transduction: *Synechocystis pixd-pixe* complex as a sensor of light intensity. *J Am Chem Soc*, May 2012.
- [162] J. J. Tesmer, R. K. Sunahara, A. G. Gilman, and S. R. Sprang. Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with $gs\alpha$ gtp γ s. *Science*, 278(5345):1907–1916, Dec 1997.
- [163] J. J. Tesmer, R. K. Sunahara, R. A. Johnson, G. Gosselin, A. G. Gilman, and S. R. Sprang. Two-metal-ion catalysis in adenylyl cyclase. *Science*, 285(5428):756–760, Jul 1999.
- [164] I. Tews, F. Findeisen, I. Sinning, A. Schultz, J. E. Schultz, and J. U. Linder. The structure of a ph-sensing mycobacterial adenylyl cyclase holoenzyme. *Science*, 308(5724):1020–1023, May 2005.
- [165] L. Theogarajan. Strategies for restoring vision to the blind: current and emerging technologies. *Neurosci Lett*, 519(2):129–133, Jun 2012.
- [166] J. E. Toettcher, D. Gong, W. A. Lim, and O. D. Weiner. Light control of plasma membrane recruitment using the phy-pif system. *Methods Enzymol*, 497:409–423, 2011.
- [167] K. C. Toh, I. H. M. van Stokkum, J. Hendriks, M. T. A. Alexandre, J. C. Arents, M. A. Perez, R. van Grondelle, K. J. Hellingwerf, and J. T. M. Kennis. On the signaling mechanism and the absence of photoreversibility in the appa bluf domain. *Biophys J*, 95(1):312–321, Jul 2008.

- [168] H. Topal, N. B. Fulcher, J. Bitterman, E. Salazar, J. Buck, L. R. Levin, M. J. Cann, M. C. Wolfgang, and C. Steegborn. Crystal structure and regulation mechanisms of the cyab adenylyl cyclase from the human pathogen *pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol*, 416(2):271–286, Feb 2012.
- [169] H.-C. Tsai, F. Zhang, A. Adamantidis, G. D. Stuber, A. Bonci, L. de Lecea, and K. Deisseroth. Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science*, 324(5930):1080–1084, May 2009.
- [170] N. Tschowri, S. Busse, and R. Hengge. The bluf-eal protein ycgf acts as a direct anti-repressor in a blue-light response of *escherichia coli*. *Genes Dev*, 23(4):522–534, Feb 2009.
- [171] N. Tschowri, S. Lindenberg, and R. Hengge. Molecular function and potential evolution of the biofilm-modulating blue light-signalling pathway of *escherichia coli*. *Mol Microbiol*, Jul 2012.
- [172] A. Tyagi, A. Penzkofer, J. Griesse, I. Schlichting, N. V. Kirienko, and M. Gomelsky. Photodynamics of blue-light-regulated phosphodiesterase blrp1 protein from *klebsiella pneumonia* and its photoreceptor bluf domain. *Chemical Physics*, 354:130–141, 2008.
- [173] M. Unno, S. Kikuchi, and S. Masuda. Structural refinement of a key tryptophan residue in the bluf photoreceptor appa by ultraviolet resonance raman spectroscopy. *Biophys J*, 98(9):1949–1956, May 2010.
- [174] M. Unno, S. Masuda, T. aki Ono, and S. Yamauchi. Orientation of a key glutamine residue in the bluf domain from appa revealed by mutagenesis, spectroscopy, and quantum chemical calculations. *J Am Chem Soc*, 128(17):5638–5639, May 2006.
- [175] M. Unno, R. Sano, S. Masuda, T.-A. Ono, and S. Yamauchi. Light-induced structural changes in the active site of the bluf domain in appa by raman spectroscopy. *J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys*, 109(25):12620–12626, Jun 2005.
- [176] M. Unno, Y. Tsukiji, K. Kubota, and S. Masuda. N-terminal truncation does not affect the location of a conserved tryptophan in the bluf domain of appa from *rhodobacter sphaeroides*. *J Phys Chem B*, 116(30):8974–8980, Aug 2012.
- [177] H. Wang, Y. Sugiyama, T. Hikima, E. Sugano, H. Tomita, T. Takahashi, T. Ishizuka, and H. Yawo. Molecular determinants differentiating photocurrent properties of two channelrhodopsins from *chlamydomonas*. *J Biol Chem*, 284(9):5685–5696, Feb 2009.
- [178] S. Weber, C. Schroeder, S. Kacprzak, T. Mathes, R. M. Kowalczyk, L.-O. Essen, P. Hegemann, E. Schleicher, and R. Bittl. Light-generated paramagnetic intermediates in bluf domains. *Photochem Photobiol*, 87(3):574–583, 2011.
- [179] S. Weissenberger, C. Schultheis, J. F. Liewald, K. Erbguth, G. Nagel, and A. Gottschalk. Paca—an optogenetic tool for in vivo manipulation of cellular camp levels, neurotransmitter release, and behavior in *caenorhabditis elegans*. *J Neurochem*, 116(4):616–625, Feb 2011.

- [180] J. A. Winger, E. R. Derbyshire, M. H. Lamers, M. A. Marletta, and J. Kuriyan. The crystal structure of the catalytic domain of a eukaryotic guanylate cyclase. *BMC Struct Biol*, 8:42, 2008.
- [181] I. B. Witten, S.-C. Lin, M. Brodsky, R. Prakash, I. Diester, P. Anikeeva, V. Gradinaru, C. Ramakrishnan, and K. Deisseroth. Cholinergic interneurons control local circuit activity and cocaine conditioning. *Science*, 330(6011):1677–1681, Dec 2010.
- [182] J. J. Wolken. Euglena: the photoreceptor system for phototaxis. *J Protozool*, 24(4):518–522, Nov 1977.
- [183] Q. Wu and K. H. Gardner. Structure and insight into blue light-induced changes in the blrp1 bluf domain. *Biochemistry*, 48(12):2620–2629, Mar 2009.
- [184] Q. Wu, W.-H. Ko, and K. H. Gardner. Structural requirements for key residues and auxiliary portions of a bluf domain. *Biochemistry*, 47(39):10271–10280, Sep 2008.
- [185] Y. I. Wu, D. Frey, O. I. Lungu, A. Jaehrig, I. Schlichting, B. Kuhlman, and K. M. Hahn. A genetically encoded photoactivatable rac controls the motility of living cells. *Nature*, 461(7260):104–108, Sep 2009.
- [186] F. Wunder, A. Rebmann, A. Geerts, and B. Kalthof. Pharmacological and kinetic characterization of adrenomedullin 1 and calcitonin gene-related peptide 1 receptor reporter cell lines. *Mol Pharmacol*, 73(4):1235–1243, Apr 2008.
- [187] A. Yamamoto, T. Iwata, Y. Sato, D. Matsuoka, S. Tokutomi, and H. Kandori. Light signal transduction pathway from flavin chromophore to the j alpha helix of arabidopsis phototropin1. *Biophys J*, 96(7):2771–2778, Apr 2009.
- [188] S. Z. Yan, Z. H. Huang, R. S. Shaw, and W. J. Tang. The conserved asparagine and arginine are essential for catalysis of mammalian adenylyl cyclase. *J Biol Chem*, 272(19):12342–12349, May 1997.
- [189] X. Yao, M. K. Rosen, and K. H. Gardner. Estimation of the available free energy in a lov2-j alpha photoswitch. *Nat Chem Biol*, 4(8):491–497, Aug 2008.
- [190] H. Yasukawa, N. Konno, Y. Haneda, B. Yamamori, M. Iseki, M. Shibusawa, Y. Ono, K.-I. Kodaira, H. Funada, and M. Watanabe. Photomanipulation of antibiotic susceptibility and biofilm formation of escherichia coli heterologously expressing photoactivated adenylyl cyclase. *J Gen Appl Microbiol*, 58(3):183–190, 2012.
- [191] O. Yizhar, L. E. Fenno, M. Prigge, F. Schneider, T. J. Davidson, D. J. O’Shea, V. S. Sohal, I. Goshen, J. Finkelstein, J. T. Paz, K. Stehfest, R. Fudim, C. Ramakrishnan, J. R. Huguenard, P. Hegemann, and K. Deisseroth. Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature*, 477(7363):171–178, Sep 2011.

- [192] S. K. Yoo, Q. Deng, P. J. Cavnar, Y. I. Wu, K. M. Hahn, and A. Huttenlocher. Differential regulation of protrusion and polarity by pi3k during neutrophil motility in live zebrafish. *Dev Cell*, 18(2):226–236, Feb 2010.
- [193] S. Yoshikawa, T. Suzuki, M. Watanabe, and M. Iseki. Kinetic analysis of the activation of photoactivated adenylyl cyclase (pac), a blue-light receptor for photomovements of euglena. *Photochem Photobiol Sci*, 4(9):727–731, Sep 2005.
- [194] H. Yuan, S. Anderson, S. Masuda, V. Dragnea, K. Moffat, and C. Bauer. Crystal structures of the synechocystis photoreceptor slr1694 reveal distinct structural states related to signaling. *Biochemistry*, 45(42):12687–12694, Oct 2006.
- [195] H. Yuan and C. E. Bauer. Pixe promotes dark oligomerization of the bluf photoreceptor pixd. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(33):11715–11719, Aug 2008.
- [196] H. Yuan, V. Dragnea, Q. Wu, K. H. Gardner, and C. E. Bauer. Mutational and structural studies of the pixd bluf output signal that affects light-regulated interactions with pixe. *Biochemistry*, 50(29):6365–6375, Jul 2011.
- [197] M. Zaccolo. camp signal transduction in the heart: understanding spatial control for the development of novel therapeutic strategies. *Br J Pharmacol*, 158(1):50–60, Sep 2009.
- [198] F. Zhang, L.-P. Wang, M. Brauner, J. F. Liewald, K. Kay, N. Watzke, P. G. Wood, E. Bamberg, G. Nagel, A. Gottschalk, and K. Deisseroth. Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature*, 446(7136):633–639, Apr 2007.
- [199] Y. Zhong and C. F. Wu. Altered synaptic plasticity in drosophila memory mutants with a defective cyclic amp cascade. *Science*, 251(4990):198–201, Jan 1991.
- [200] J. H. Zippin, Y. Chen, P. Nahirney, M. Kamenetsky, M. S. Wuttke, D. A. Fischman, L. R. Levin, and J. Buck. Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in distinct signaling microdomains. *FASEB J*, 17(1):82–84, Jan 2003.
- [201] B. D. Zoltowski and B. R. Crane. Light activation of the lov protein vivid generates a rapidly exchanging dimer. *Biochemistry*, 47(27):7012–7019, Jul 2008.

Abbildungsverzeichnis

1.1	cAMP und seine physiologische Bedeutung	2
1.2	Domänenorganisation und allgemeine Merkmale von Adenylatzyklen	4
1.3	Enzymatische Katalyse durch Adenylatzyklen	6
1.4	Das Prinzip der Optogenetik	8
1.5	Lichtwahrnehmung natürlicher Photorezeptoren	10
1.6	Optogenetische Anwendungen von Photorezeptoren	13
1.7	Struktur von Slr1694	17
1.8	Photoaktivierung in BLUF-Domänen nach Gauden <i>et al.</i> und Bonetti <i>et al.</i> [10, 35]	18
1.9	Anordnung der C-terminalen Helices in den Strukturen von Slr1694 und BlrP1	21
1.10	Aufbau und Lokalisation des <i>Euglena gracilis</i> Photorezeptors euPAC	22
1.11	Lichtinduzierte Adenylatzyklaseaktivität von euPAC α in <i>C.elegans</i> [179]	24
1.12	Domänen-Organisation kleiner PACs und Ursprungsorganismen	27
1.13	Aminosäure-Sequenz-Alignments kleiner PACs	28
2.1	Bakterieller PAC-Funktionstest auf MacConkey-Agar	33
2.2	PAC-Funktionsassay in <i>Xenopus</i> -Oozyten nach [145]	34
2.3	bPAC-vermittelte Photoströme sind durch die Lichtdosis titrierbar	36
2.4	Injektionsverhältnisse und nPAC-vermittelte Photoströme in <i>Xenopus</i> -Oozyten	37
2.5	PAC-Funktionsassay in <i>CHO</i> -Reporterzellen [186]	39
2.6	Optische Kontrolle des cAMP-Spiegels in <i>CHO</i> -Zellen durch bPAC	40
2.7	PAC-vermittelte Lumineszenz in <i>CHO</i> -Zellen	41

2.8	Präparation von bPAC aus <i>E. coli</i> unter Verwendung verschiedener Expressionskonstrukte	44
2.9	Proteinausbeuten aus verschiedenen Expressionskonstrukten . .	45
2.10	Bestimmung der molekularen Größe von bPAC und Varianten mittels Größenausschlusschromatographie	46
2.11	Absorptionsspektren kleiner PACs im Dunkeln und nach Belichtung	48
2.12	Kinetik des Signalzustandes kleiner PACs	49
2.13	Sequenz von bPAC Licht-minus-Dunkel-Differenzspektren	50
2.14	Flavinzusammensetzung von nPAC76	51
2.15	Photozyklus-Schema von nPAC76	52
2.16	FTIR-Differenzspektren von bPAC und der bPAC BLUF-Domäne	55
2.17	HPLC-basierte Nukleotidanalyse und Eichung	56
2.18	Lichtinduzierte Zyklaseaktivität von bPAC	57
2.19	Spezifische Adenylatzyklase-Aktivitäten kleiner PACs im Dunkeln und im Licht	58
2.20	Substratabhängigkeit und Enzymverhalten von bPAC unter dauerhafter Belichtung	60
2.21	Enzymkinetik und Lichtsättigung von bPAC nach Lichtpulsen .	60
2.22	pH- und Temperaturabhängigkeit der Lichtaktivität von bPAC .	62
2.23	Lichtinduzierte cAMP-Produktion in PAC-exprimierenden <i>Xenopus</i> -Oozyten	64
2.24	bPAC-Funktionsassay in Hippocampus-Neuronen	66
2.25	Funktionaler Vergleich zwischen bPAC und euPAC α in CNG-Kanal koexprimierenden Ratten-Neuronen	67
2.26	Funktionaler Vergleich zwischen bPAC und euPAC α in transgenen <i>Drosophila</i> -Fliegen	69
2.27	Verhalten der isolierten Zyklase (cyc)	71
2.28	Berechnete Struktur der bPAC BLUF-Domäne mit interessanten Aminosäuren	73
2.29	Photochemische und enzymatische Eigenschaften von bPAC-Varianten mit Wirkung auf die Signaltransduktion	74
2.30	Photochemische und enzymatische Eigenschaften natürlicher bPAC-Varianten und der Variante bPAC-Q49A	75
2.31	Vergleich der Dunkelaktivitäten von bPAC-WT und bPAC-S27A bei hoher Proteinkonzentration	76

2.32	Radikalbildung und spezifische Aktivität in bPAC-Y7F	77
3.1	Vergleich der Aktivitäten kleiner PACs <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> . . .	80
3.2	Enzymatische Eigenschaften von euPAC und bPAC	83
3.3	Gegenüberstellung von euPAC α - und bPAC-vermittelten Effekten in Gastsystemen	85
3.4	Anwendungsmerkmale von bPAC und anderen cAMP-Stimulatoren	88
3.5	Antiparallele Organisation von Zyklasen und bPAC-Dimeren . .	90
3.6	Aminosäuren mit Einfluss auf die Kofaktorabsorption	92
3.7	Konzept einer BLUF-aktivierten Zyklase	95
3.8	Flavin-Photoprodukte	97
3.9	Kompetitiver Elektronentransfer in bPAC	98
3.10	Regulation der pH-sensitiven Adenylatzyklase Rv1264 aus [164]	100
3.11	Anwendungen von bPAC	102
4.1	Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme	109
4.2	Verwendete Vektoren und Konstrukte	110
4.3	Protokoll zum Amplifizieren von DNA-Fragmenten mittels PCR	112
4.4	Protokoll für QuickChange-Mutagenese	113
4.5	Antikörper für Immunoblotting	117
4.6	Darstellung einer Spannungs- und Beleuchtungsabfolge zur Aufnahme von Photoströmen	121
7	Flankierende Primer zum Amplifizieren spezifischer DNA-Abschnitte	124
8	Primer für die ortsspezifische Mutagenese von bPAC	125
9	Absorptionsverhalten von bPAC-Y7F nach Prof. A. Penzkofer .	126
10	Strukturformeln und Absorptionseigenschaften von Flavin in verschiedenen Oxidations- und Protonierungsformen nach Prof. A. Penzkofer	127
11	Ein mögliches Photozyklusmodell für bPAC-Y7F und Parameter nach Prof. A. Penzkofer	128
12	cAMP-Umsatz und spezifische Aktivität von bPAC im Zeitverlauf	130
13	Spezifische Aktivität von bPAC in An- und Abwesenheit von 5 mM β -Mercaptoethanol	131

14	Lichtinduzierte cAMP-Produktion in bPAC-exprimierenden <i>Xenopus</i>-Oozyten und Elutionsprofile von nPAC76, BSA und Ovalbumin	131
----	--	-----

Danksagung

Viele haben durch ihr Zutun zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen; einige möchte ich an dieser Stelle besonders erwähnen.

Prof. Peter Hegemann hat meine Arbeit an diesem spannenden Thema ermöglicht, gefördert und begleitet. Mit seinem Rat stand er unterstützend zur Seite. Eine große Bereicherung war darüber hinaus das durch ihn geschaffene, exzellente wissenschaftliche Umfeld und die vielfältigen Kooperationen.

Maila Reh hat durch ihre Mithilfe am Oozyten-Funktionstest viel zu dieser Arbeit beigetragen. Sie stellte die Oozyten bereit, injizierte sie und führte die TEVC-Messungen mit großer Sorgfalt aus. **Lena Pustogowa** hat in der Zellkultur und bei der Etablierung des CHO-Funktionstests engagiert mitgearbeitet. **Dr. Rolf Hagedorn** und **Christina Mrosek** halfen mir tatkräftig bei den Messungen an der Blitzlicht-Photolyse sowie in vielen Dingen des Laboralltages. **Dr. Tilo Mathes** ermöglichte die gemeinsamen IR-Messungen in Amsterdam, begleitete mein Projekt stetig und unterstützte mich durch sein großes Wissen.

In hohem Maße hat diese Arbeit von der guten Zusammenarbeit mit unseren **Kooperationspartnern** profitiert: Prof. Wolfgang Gärtner (MPI Mühlheim) stellte die bPAC-Gene zur Verfügung und hat sich bereit erklärt Gutachter für diese Arbeit zu sein. Prof. Suneel Kateriya (Univ. Neu-Delhi) entdeckte die drei nPACs. Prof. Ilme Schlichting, Dr. Andreas Winkler und Elisabeth Hartmann (MPI Heidelberg) haben durch ihre Erfahrung einen erheblichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet. Prof. Alfons Penzkofer (Univ. Regensburg) führte die Photozyklus-Studien an nPAC76 und bPAC-Y7F durch. Prof. John Kennis (VU Amsterdam) förderte die IR-Messungen an bPAC. Dr. Frank Wunder (Fa. Bayer) übersendete uns die CHO-Zelllinie für den Säugerzelltest. Prof. Andreas Möglich (HU Berlin) stellte das Mikroplatten-Lesegerät für die Durchführung des CHO-Funktionstests zur Verfügung. Prof. Georg Nagel (Universität Würzburg), Prof. Thomas Oertner (ZIMH Hamburg) sowie Dr. Martin Schwärzel (FU Berlin) und ihre Arbeitsgruppen trugen durch viele Experimente zur Charakterisierung und Veröffentlichung von

Danksagung

bPAC bei. Prof. Franz Bartl erklärte sich als weiterer Gutachter bereit.

Meine **Kollegen** Dr. Katja Stehfest, Franziska Schneider, Carlos Gasser haben durch ihr fortwährendes Interesse, ihre kompetente Hilfsbereitschaft und durch viele Anregungen meine Arbeit bereichert. Tilo, Micha, Katja, Franziska und Carlos halfen weiter durch kritisches Korrekturlesen des Manuskriptes.

Meine **Familie** hat durch Ihre Unterstützung, Ihre Geduld und Ihren Verzicht mir den Raum für diese Arbeit gegeben.

Ihnen allen gilt an dieser Stelle mein großer und herzlicher Dank.

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, den 28.02.2013

Manuela Stierl